

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA



PRESENTA:

MVZ. MC. ZAIDA TORRES CAVAZOS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE PLATA COLOIDAL Y
DICLOROACETATO DE SODIO EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO.

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL

NOVIEMBRE 2020

DICIEMBRE DE 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA- VETERINARIA



PRESENTA:

MVZ. MC. ZAIDA TORRES CAVAZOS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE PLATA COLOIDAL Y
DICLOROACETATO DE SODIO EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO.

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

DICIEMBRE DE 2020

POSGRADO CONJUNTO
AGRONOMIA-VETERINARIA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE PLATA COLOIDAL Y
DICLOROACETATO DE SODIO EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO.

COMITÉ DE TESIS

Dra. Diana E. Zamora Ávila
Directora Interna

Dr. Moisés A. Franco Molina
Director Externo

Ph.D. Luís Edgar Rodríguez Tovar
Co-Director

Ph.D. Gustavo Hernández Vidal
Co-Director

Dr. Gustavo Moreno Degollado
Co-Director

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar por agradecer a mis padres, mis hermanos, ya que es gracias a ellos que “estoy donde estoy, y soy quien soy”, por su apoyo a través de todos mis estudios, por que han estado siempre en los acontecimientos importantes de vida, tal como este, y además porque han sabido guiarme a lo largo del camino de mi vida. A ustedes les digo gracias por todo el amor y cariño.

Quiero agradecer también, a mis profesores y asesores, especialmente a el Dr. Moisés Franco por su confianza y amistad, y el siempre apoyarme en cada trabajo, al Dr. Gustavo Moreno por todo el apoyo y amistad que me ha brindado al realizar este trabajo, al Dr. Vidal que me ha dado su confianza para trabajar con el y a la Dra. Diana por darme el cariño confianza y apoyo durante este proceso y también al Dr. Luís Edgar por su dedicación, por depositar en mí, una pizca de su experiencia y conocimientos. Pero un agradecimiento especial a todos ustedes que más que enseñar, lograron inspirar en mí una pasión por el conocimiento, y por hacerme creer en que compartir el poco o mucho conocimiento que uno pueda tener, nos hace crecer a todos. A todos ustedes les digo gracias por su vocación.

A todos ustedes les digo gracias, con una sonrisa en el rostro, porque soy la suma de todos esos momentos compartidos y de todas esas palabras de apoyo, de nuevo gracias.

“La gratitud no es solo la mayor de las virtudes, sino la madre de todas las demás.”

-Cicerón (106 a.C. - 43 a.C.)

DEDICATORIA

Les dedico esta tesis a mis padres, que así como mi educación representa el esfuerzo de su trabajo, tiempo y amor, estas páginas representan los frutos de mis estudios y aprendizaje.

A mi familia, a modo de regresarles un poco de lo mucho que me han enseñado en mi vida.

Y a cualquiera que le pueda servir la poca o mucha información que estas páginas pudieran contener.

“...Señor, concédeme la gracia de aceptar con serenidad las cosas que no puedo cambiar, la fuerza para cambiar las que deban ser cambiadas, y la sabiduría para diferenciar entre las dos...”

“Oración de la serenidad” de Reinhold Niebuhr (1892-1971).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | | |
|-------------|---|------|
| | Agradecimiento | I |
| | Dedicatoria | II |
| | Índice de contenidos | IV |
| | Lista de figuras | VII |
| | Abreviaturas | VIII |
| | Resumen | IX |
| 1 | Introducción | 1 |
| 2 | Hipótesis | 3 |
| 3 | Objetivos | 4 |
| 3.1 | Objetivo general | 4 |
| 3.2 | Objetivos particulares | 4 |
| 4 | Antecedentes | 5 |
| 4.1 | Cáncer | 5 |
| 4.2 | Melanoma | 7 |
| 4.3 | Dicloroacetato de sodio | 13 |
| 4.4 | Plata coloidal | 16 |
| 5 | Métodos | 18 |
| 5.1 | Cultivos celulares | 18 |
| 5.2 | Viabilidad celular | 18 |
| 5.3 | DCA-Na | 19 |
| 5.4 | Ag-C | 20 |
| 5.5 | Animales | 21 |
| 5.6 | Modelo de melanoma murino | 22 |
| 5.7 | Elisa para subunidades NF- κ BP65 | 23 |
| 5.8 | Producción TNF- α y NO | 23 |
| 5.9 | Inmunocitoquímica para la determinación de HMGB1, HSP70 y HSP90 | 24 |
| 5.10 | Citometría de flujo para la determinación de calreticulina | 25 |
| 5.11 | Experimento de vacunación <i>in vivo</i> | 26 |
| 6 | Resultados | 27 |
| 6.1 | DCA-Ag disminuyó la viabilidad de las células del melanoma B16F10 | 27 |
| 6.2 | Modelo de melanoma murino | 31 |
| 6.3 | Regresión tumoral inducida por Ag-DCA | 38 |
| 6.4 | Disminución de TNF- α , NF- κ B y óxido nítrico | 38 |

| | | |
|------------|--|----|
| | con los tratamientos de Ag, DCA y Ag+DCA | |
| 6.5 | Expresión y localización de HGMB1, HSP70 y HSP90 en células B16F10 tratadas con Ag, DCA o Ag+DCA | 40 |
| 6.6 | Exposición a calreticulina en células tratadas con Ag, DCA y Ag+DCA | 42 |
| 6.7 | Ag, DCA y Ag+DCA no inducen la muerte inmunogénica | 44 |
| 7 | Discusión | 46 |
| 8 | Conclusiones | 50 |
| 9 | Literatura citada | 51 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabla 1 | Parámetros diagnósticos en estadificación del melanoma | 9 |
| Tabla 2 | Etapas clínicas y patológicas del melanoma. | 10 |
| Figura 1 | Esquema comparativo, Efecto Warburg contra fosforilación oxidativa. | 15 |
| Figura 2 | Efecto del DCA-Na sobre viabilidad celular de la línea B16F10. | 28 |
| Figura 3 | Efecto de la Ag-C sobre la viabilidad celular de la línea B16F10 | 28 |
| Figura 4 | Efecto del tratamiento combinado DCA-Na + AgC sobre la viabilidad de la línea celular B16F10 | 30 |
| Figura 5 | Gráfico de variación del volumen tumoral de los ratones durante el experimento | 32 |
| Figura 6 | Evidencia fotográfica representativa de cada grupo al final de la semana 3 del tratamiento | 35 |
| Figura 7 | Viabilidad celular de las células B16F10 | 37 |
| Figura 8 | Regresión tumoral en ratones portadores de melanoma tratados con Ag + DCA | 39 |
| Figura 9 | Inmunocitoquímica de células B16F10 | 41 |
| Figura 10 | Exposición de la superficie de calreticulina en células B16F10 | 43 |
| Figura 11 | Implantación de tumores en ratones vacunados | 45 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| °C | Grados Celsius (centígrados) |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| <i>ad libitum</i> | Del latín: a placer, a voluntad |
| AgC | Plata coloidal |
| B16F10 | Línea celular de cáncer de melanoma murino |
| C57BL/6 | Cepa de ratones de laboratorio de la especie <i>Mus musculus</i> |
| CO ₂ | Bióxido de carbono |
| Da | Dalton (Unidad de masa atómica unificada, equivalente a $1.66053892 \times 10^{-24}$ g) |
| DCA-Na | Dicloroacetato de Sodio |
| DL ₁₀ | Dosis letal (10%) |
| DL ₁₀₀ | Dosis letal (100%) |
| DL ₅₀ | Dosis letal (50%) |
| DMEM-F12 | Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12 |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| ELISA | Por sus siglas en inglés: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| g | Gramos |
| g/mol | Gramos por mol |
| <i>in vitro</i> | Experimento realizado en cultivos (del latín: dentro del vidrio) |
| <i>in vivo</i> | Experimento realizado en organismos vivos (del latín: dentro de lo vivo) |
| HGMB1 | Proteínas de alta movilidad del grupo 1 |
| HSP70 | Proteínas de shock térmico de 70 KDa |
| HSP90 | Proteínas de shock térmico de 90 KDa |
| INEGI | Instituto Nacional de Estadística y Geografía |
| KDa | Kilodaltons |
| Kg | Kilogramo |
| M | Molar |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| NAD ⁺ | Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado) |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido) |
| nm | nanómetro |
| NO | Óxido nítrico |

| | |
|----------------|---|
| O ₂ | Oxígeno molecular |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PBMC | Por sus siglas en inglés: células mononucleares de sangre periférica |
| RB | Proteína del retinoblastoma (supresora de tumores) |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SFB | Suero fetal bobino |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TNM | Sistema de estadificación del cáncer |
| P53 | Proteína con papel importante en la muerte celular programada |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| NF- κ B | Factor nuclear <i>Kappa</i> B |
| TUNEL | Por sus siglas en inglés: Marcaje del extremo terminal dUTP de deoxinucleótidil transferasa |
| U | Unidades |
| UV | Radiación ultravioleta (radiación electromagnética de λ = 15nm – 400nm) |
| VCR (%) | Viabilidad celular relativa expresada en porciento |

RESUMEN

El dicloroacetato de sodio, una sal derivada del ácido dicloroacético, es empleado actualmente en diferentes padecimientos metabólicos; la plata coloidal, es molécula utilizada ampliamente como un desinfectante en alimentos y agua; estas drogas han tomado importancia desde el punto de vista de la terapéutica del cáncer. En este estudio el objetivo principal fue evaluar la eficiencia de la plata coloidal y el dicloroacetato de sodio como agentes de doble función para su uso en el tratamiento del melanoma. Esta estrategia esta diseñada para aumentar la actividad de estos dos compuestos que afectan la integridad del ADN y las mitocondrias en diferentes niveles. Se realizaron ensayos de viabilidad celular relativa en células B16F10 (línea celular de melanoma murino) en cultivos, donde se determinaron las dosis letales. Así mismo, se determinó que los tratamientos individuales ejercían un efecto de citotoxicidad dependiente de dosis sobre las células tumorales en cultivo, en los tratamientos combinados no se observó este efecto inhibitorio. Los tratamientos con las moléculas antes mencionadas y sus combinaciones también se llevaron a un modelo de melanoma murino en la cepa C57BL/6, los animales se distribuyeron en 4 grupos experimentales, incluyendo un control y 3 esquemas terapéuticos. Los grupos cuyos tratamientos incluían plata coloidal mostraron una inhibición del desarrollo tumoral temprano, a diferencia de los otros tratamientos y el grupo control, en los cuales se mantuvo un crecimiento tumoral a lo largo del experimento. En ningún grupo tratado se presentó metástasis. En conclusión nuestros resultados mostraron que la combinación de plata coloidal y dicloroacetato de sodio es más efectiva que cada tratamiento solo y que el mecanismo antitumoral no es a través de la muerte celular inmunogénica. Además, este estudio puede contribuir ampliamente al desarrollo de nanopartículas de plata cargadas con dicloroacetato y al diseño de formulaciones farmacológicas específicas para combatir el melanoma y otros tipos de cáncer.

1.- INTRODUCCIÓN

El cáncer es definido como un grupo de enfermedades que se caracterizan por la proliferación de células anormales, y puede producirse en cualquier tejido dentro de cualquier órgano. Su etiología es de origen multifactorial, incluye factores endógenos (mutaciones genéticas, alteraciones metabólicas) y exógenos (exposición a químicos mutagénicos y ciertos fármacos, y radiación ionizante), y su desarrollo generalmente se debe a una combinación de estos factores (Devi, 2004; Beers, 2006).

Esta enfermedad es una de las principales causas de muerte en el mundo, solo en el año 2012 se diagnosticaron 14.1 millones de casos nuevos y causó 8.2 millones de decesos (OMS, 2012). En el caso de México, el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año hay 128 mil casos nuevos (INEGI, 2014).

El melanoma, es una de las formas más agresivas de cáncer de piel, se desarrolla en las células cutáneas, generalmente melanocitos, que son las células responsables de producir el pigmento de la piel, la melanina. Este tipo de cáncer es más frecuente en la población caucásica (de piel blanca) que en otros grupos étnicos, es también más frecuente en hombres que en las mujeres (Saranga-Perry, *et. al.*, 2014).

En México no existen estadísticas fidedignas de melanoma en la población, sin embargo, se reporta que en el periodo de 2007 a 2009, la prevalencia de melanoma en la población hispana en Estados Unidos era de aproximadamente 1 caso por cada 191 hombres y de 1 caso por cada 194 mujeres (American Cancer Society, 2013).

Las células tumorales poseen mecanismos que les permiten escapar a la respuesta inmune y proliferar de manera desregulada, y el melanoma no es la excepción. Actualmente la cirugía para lesiones tumorales localizadas y los tratamientos quimioterapéuticos suelen ser las opciones terapéuticas habituales, sin embargo, estos tratamientos no son efectivos en etapas avanzadas de la enfermedad y algunos casos suelen ser notoriamente resistentes a las drogas quimioterapéuticas (Hanahan y Weinberg, 2011).

En años recientes, la identificación de mutaciones genéticas importantes para la patogénesis de este cáncer ha llevado a la aprobación e implementación de tratamientos dirigidos y otros esquemas terapéuticos. Por las razones antes mencionadas, se requiere nuevas estrategias terapéuticas que exploten las características biológicas de este desorden (Saranga-Perry, *et. al.*, 2014).

2.- HIPÓTESIS

El tratamiento con dicloroacetato de sodio, plata coloidal, y/o sus combinaciones afectan la integridad del ADN y la actividad de las mitocondrias para aumentar la respuesta antitumoral en el tratamiento del melanoma.

3.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de dicloroacetato de sodio, plata coloidal, y sus combinaciones como agentes de doble función que afecten la integridad del ADN y la actividad de las mitocondrias para aumentar la respuesta antitumoral en el tratamiento de melanoma.

3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la dosis letal (DL_{10} , DL_{50} , y DL_{100}) de dicloroacetato de sodio, plata coloidal *in vitro* sobre la línea celular murina B16F10.
2. Establecer un modelo de melanoma murino en la cepa de ratones C57BL/6.
3. Determinar el efecto terapéutico de dicloroacetato de sodio, plata coloidal, y sus combinaciones en un modelo de melanoma murino.

4.- ANTECEDENTES

4.1.- CÁNCER

Las células que dan origen a clonas que pueden expandirse de una manera descontrolada producirán un tumor (también llamado neoplasia). Los tumores que carecen de crecimiento indefinido y que no invaden tejidos circundantes o distales sanos, son llamados benignos. Por el contrario, los tumores que proliferan extensamente son llamados malignos, el término cáncer es usado específicamente para los tumores malignos (Owen *et al*, 2013).

Se denomina colectivamente cáncer a un amplio grupo de enfermedades que se pueden originar en cualquier tejido del cuerpo. Y su etiología se debe a combinaciones de factores exógenos, como la exposición a diversas fuentes de radiación ionizante y no-ionizante, factores físico-químicos como sustancias químicas mutagénicas y otros materiales físicos como el asbesto, elementos patogénicos como virus, entre otros factores; y factores endógenos, como mutaciones genéticas congénitas, alteraciones metabólicas, predisposición, historial familiar, etc. (Devi, 2004).

Una vez que un agente iniciador, como los antes mencionados, ha comprometido la capacidad de reparación del ADN celular o se han alterado los mecanismos reguladores del crecimiento y proliferación celular (como el caso de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores), se dice que dicha célula ha entrado en el proceso de carcinogénesis, más específicamente, en la etapa de iniciación, una vez que la célula entra en esta etapa el proceso es irreversible. La promoción es la segunda etapa de la carcinogénesis, y se caracteriza por la intervención de promotores moleculares y celulares que activan la expansión selectiva de la célula iniciada, el avance de esta etapa depende de la exposición al promotor y la sensibilidad celular al mismo. Finalmente, la progresión maligna es la última etapa, y es mediada por agentes progresores endógenos y/o exógenos (como incorporación de ADN viral), y culmina en una alteración completa del sistema mitótico celular (Croce, 2008; Domínguez-Bodoa, 2004; Beers, 2006).

Como ya se mencionó, el cáncer presenta manifestaciones clínicas especiales y dependientes del tejido donde se ha originado y de los factores que influyeron en su transformación maligna, sin embargo, estas enfermedades se caracterizan colectivamente por presentar seis capacidades biológicas distintivas, adquiridas durante la transformación celular maligna.

La principal, “señalización proliferativa sostenida”, es considerada como una habilidad fundamental en las células tumorales. Los tejidos sanos, en contraste, poseen mecanismos que les permiten controlar la producción y liberación de señalizadores de crecimiento y división celular en momentos específicos, y por lo tanto mantienen la homeostasis y su arquitectura tisular prácticamente intactas. Las células tumorales, por el contrario, se valen de diversos mecanismos como hipersensibilidad en receptores de membrana, señalización intracelular, estimulación autocrina por medio de ligandos, entre otros (Hanahan y Weinberg, 2011).

“Evasión de supresores de crecimiento”, esta habilidad complementa la antes mencionada, las células tumorales deben evadir mecanismos que regulan negativamente la proliferación celular. Genes supresores de tumores como los que codifican para las proteínas RB (retinoblastoma) y P53, actúan como pivotes centrales que gobiernan las decisiones de proliferación, senescencia y apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011; Croce, 2008).

La “resistencia a la muerte celular programada” es una habilidad que conlleva una serie de estrategias simultáneas, sin embargo, la más común de ellas es la pérdida de la función supresora de tumor de P53, y sobreexpresión de reguladores anti-apoptóticos y a su vez limitación de la expresión de factores pro-apoptóticos (Hanahan y Weinberg, 2011; Croce, 2008).

A diferencia de las células tumorales, las células normales son capaces de llevar a cabo una cantidad limitada de veces el ciclo de crecimiento y división celular. Esta limitación ha sido asociada con dos barreras de limitantes: la senescencia, un estado irreversible no-proliferativo pero viable, y fase de crisis, en la cual la mayoría de las células de una población muere. Cuando una célula es capaz de esquivar estas dos

barreras se dice que ha alcanzado un estado de “Inmortalidad replicativa” la cual es otra habilidad adquirida de las células tumorales (Hanahan y Weinberg, 2011).

La “angiogénesis inducida” le permite al tejido tumoral suplir sus necesidades de nutrimentos y oxigenación, este proceso es gobernado por factores celulares y señalización que estimulan o inhiben receptores de superficie expresados por células vasculares endoteliales, como el factor de crecimiento vascular endotelial-A (VEGF-A) y la trombosondina-1 (TSP-1), respectivamente (Hanahan y Weinberg, 2011; Devi, 2004).

Finalmente, “Invasividad y metástasis”, es una habilidad cuyos mecanismos siguen siendo objetos de investigación dado el poco conocimiento que se tiene sobre ellos, sin embargo, se sabe que las células tumorales presentan alteraciones morfológicas, así como genes que modifican la adherencia célula-célula y célula-matriz extracelular se encuentran alterados, por ejemplo la expresión de e-cadherina (Hanahan y Weinberg, 2011).

4.2.-MELANOMA

4.2.1.-PATOLOGIA Y FACTORES DE RIESGO

El melanoma es la forma más agresiva de cáncer de piel, este tipo de cáncer se origina en los melanocitos que son células especializadas de la epidermis, estas células son las encargadas de producir la melanina, el pigmento que da coloración a la piel y además la protege de la radiación de los rayos UV. Existen dos tipos de melanina, la eumelanina, que es la más abundante en el cuerpo humano, y es la responsable de la coloración café y negra, es también el tipo de melanina que proporciona mayor protección contra la radiación UV; y la feomelanina, este tipo de melanina produce una coloración que va del rosa al rojo, es más abundante en el cabello pelirrojo, los labios, pezones, glánde y vagina (Gutiérrez-Vidrio y Cortés-Lozano, 2007; Saranga-Perry *et al*, 2014).

La evidencia actual relaciona fuertemente que el aumento en el tiempo de exposición y la intensidad de los rayos UV del sol, están relacionados al aumento en la

incidencia del melanoma en los últimos años. Factores fenotípicos (genéticos), como una baja producción de melanina, tales como la piel blanca (fototipos I y II del sistema de clasificación de Fitzpatrick), cabello rubio y pelirrojo, y color claro de ojos, están asociados con un alto riesgo de padecer melanoma. Otros factores de riesgo incluyen, lunares atípicos, alto número de lunares, historial familiar de melanoma y otras formas de cáncer (Saranga-Perry *et al.* 2014; Valachovic y Zurbenko, 2014; Roberts, 2009).

4.2.2.-DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN

La mayoría de los melanomas suelen llamar la atención del afectado al presentar síntomas y signos, tales como, manchas, abultamientos y erupciones en la piel, que suelen crecer o cambiar de color con el tiempo. Si el médico sospecha de cáncer de piel, hará una entrevista al paciente para conocer su historial médico, casos de cáncer en la familia, y un examen físico que incluye: examinación de la lesión por medio de una técnica llamada dermatoscopia, que le permitirá observar a detalle áreas específicas de la lesión; un examen superficial de los ganglios linfáticos; y finalmente, si el médico sospecha que se puede tratar de melanoma, se tomara una biopsia de la lesión, solo se puede confirmar melanoma por medio de histopatología (American Cancer Society, 2015; Orzan *et al.*, 2015).

El “The American Joint Commission on Cancer TNM Staging System”, o TNM, es el sistema de referencia para determinar la etapa de este tipo de cáncer, el cual se basa en factores como tamaño y profundidad de la lesión neoplásica, y la metástasis a nódulos linfáticos y otros órganos. Para una correcta clasificación de la etapa se requiere de una biopsia para determinar la profundidad de la lesión, su grado de invasión, ritmo mitótico, y la presencia o ausencia de ulceración (Balch *et al.*, 2009).

Etapas:

Etapas I y II: se utiliza la profundidad en milímetros y la ulceración en los melanomas localizados. Etapa III: se determina de acuerdo a las metástasis ganglionares, carga tumoral y la ulceración en melanomas con metástasis regional. Etapa IV: sitio anatómico de la metástasis en melanomas con metástasis distal.

A continuación se muestran tablas con los parámetros y factores necesarios en la clasificación del estadio clínico y patológico de la enfermedad (**Tablas 1 y 2**).

| T | Profundidad | Ulceración |
|------------|---|--|
| T1 | 1mm | a: sin ulceración y nivel II/III |
| | | b: con ulceración o nivel IV/V |
| T2 | 1.01 - 2mm | a: sin ulceración |
| | | b: con ulceración |
| T3 | 2.01 - 4mm | a: sin ulceración |
| | | b: con ulceración |
| T4 | > 4mm | a: sin ulceración |
| | | b: con ulceración |
| N | N° de Ganglios | Masa tumoral ganglionar |
| N1 | 1 | a: micrometástasis |
| | | b: macrometástasis |
| N2 | 2-3 | a: micrometástasis |
| | | b: macrometástasis |
| | | c: metástasis en tránsito o satelitosis sin ganglios positivos |
| N3 | 4 o más, metástasis en tránsito o satelitosis con metástasis ganglionares | a: micrometastasis |
| | | b: macrometastasis |
| M | Sitio | LDH sérica |
| M1a | Piel, subcutis o ganglionar a distancia | Normal |
| M1b | Pulmonar | Normal |
| M1c | Cualquier otra metástasis visceral | Normal |
| | Cualquier metástasis a distancia | Elevada |

Tabla 1.- Aquí se resume los factores a examinar en pacientes. Se divide en tres secciones: T, para la profundidad; N, para el número de ganglios linfáticos afectados; y M, metástasis a órganos o tejidos, regionales o distales. Una vez determinados todos los factores, se utilizan los indicadores de la primera columna (izq.) para clasificar la etapa en la que se encuentra el paciente (Gutiérrez-Vidrio y Cortés-Lozano, 2007).

| Estadio | Estadiaoje Clínicoo | | | Estadiaoje Patológicoo | | |
|-------------|---------------------|-------------|----|------------------------|-------------|----|
| | T | N | M | T | N | M |
| 0 | Tis | N0 | M0 | Tis | N0 | M0 |
| IA | T1a | N0 | M0 | T1a | N0 | M0 |
| IB | T1b | N0 | M0 | T1b | N0 | M0 |
| | T2a | N0 | M0 | T2a | N0 | M0 |
| IIA | T2b | N0 | M0 | T2b | N0 | M0 |
| | T3a | N0 | M0 | T3a | N0 | M0 |
| IIB | T3b | N0 | M0 | T3b | N0 | M0 |
| | T4a | N0 | M0 | T4a | N0 | M0 |
| IIC | T4b | N0 | M0 | T4b | N0 | M0 |
| III | Cualquier T | N1 | M0 | | | |
| | | N2 | M0 | | | |
| | | N3 | M0 | | | |
| IIIA | | | | T1-4a | N1a | M0 |
| | | | | T1-4a | N2a | M0 |
| IIIB | | | | T1-4b | N1a | M0 |
| | | | | T1-4b | N2a | M0 |
| | | | | T1-4a | N1b | M0 |
| | | | | T1-4a | N2b | M0 |
| | | | | T1-4a/b | N2c | M0 |
| IIIC | | | | T1-4b | N1b | M0 |
| | | | | T1-4b | N2b | M0 |
| | | | | Cualquier T | N3 | M0 |
| IV | Cualquier T | Cualquier N | M1 | Cualquier T | Cualquier N | M1 |

Tabla 2.- Los indicadores obtenidos la Tabla 1 son utilizados para determinar el estadio clínico del paciente, y patológico de la lesión neoplásica. (nota: N0 quiere decir que no hay ganglios linfáticos afectados, y M0 quiere decir que no presenta metástasis) (Gutiérrez-Vidrio y Cortés-Lozano, 2007).

4.2.3.-TRATAMIENTOS ACTUALES

Aunque en la actualidad existen tratamientos no invasivos como la inmunoterapia en las unidades hospitalarias se suele elegir métodos tradicionales como la extirpación quirúrgica completa con márgenes para melanomas localizados, y esquemas de tratamiento combinando varias técnicas para lesiones neoplásicas con metástasis distales, estos pueden incluir escisión quirúrgica, radio terapia, perfusión aislada de la extremidad afectada, hipertermia local, crioterapia, electrocirugía, cirugía láser, quimioterapia local o sistémica, y en menos frecuencia se utilizan terapias genéticas. Como ya se mencionó la inmunoterapia y otras técnicas inmunológicas de nueva generación ofrecen una alternativa de mínima a no invasiva, tal es el caso de la terapia celular adoptiva, sin embargo, estas estrategias terapéuticas aún son sujeto de varios estudios, con éxitos notables en casos clínicos de leucemia, no obstante, su estandarización y aplicación rutinaria en casos de cáncer en unidades hospitalarias aún es lejana (Gutiérrez-Vidrio y Cortez-Lozano, 2007; Rughani *et al*, 2012).

Destaca el hecho de que tratamientos actuales como radio y quimioterapia, suelen presentar en la mayoría de los pacientes efectos secundarios como pérdida de cabello, problemas de sueño, problemas digestivos, náuseas y vómito, y sensación de cansancio general, que afectan el estado anímico y psicológico del paciente, lo que los lleva a suspender el tratamiento o abandonarlo por completo (Love *et al*, 1989).

4.2.4.-PROFILAXIS

La aparición de cáncer de piel, especialmente de tipo melanoma esta principalmente relacionado al daño causado por la radiación UV solar y de otras fuentes, por ejemplo cabinas de bronceado, por lo tanto se debe reducir al máximo la exposición a este tipo de radiación. En situaciones laborales donde se requiera estar en exteriores se recomienda el uso correcto del bloqueador solar, sobre todo recomendado para los tipos I y II del sistema de clasificación de Fitzpatrick, y el uso de ropa adecuada, como manga larga y sombrero (Roberts, 2009).

La autoexploración de lunares y manchas en la piel es de suma importancia, ya que puede llevar a un diagnóstico y tratamiento temprano, la regla *ABCD* describe las características clínicas visuales más importantes del melanoma, esta regla incluye lesiones pigmentadas con *asimetría, bordes irregulares, cambios de color, y diámetro mayor a 6mm* (Gutiérrez-Vidrio y Cortez-Lozano, 2007).

Los sobrevivientes de este tipo de cáncer tienen un alto riesgo de desarrollar nuevas lesiones neoplásicas, por lo tanto es de importancia que estos y sus familiares sean entrenados para identificar de manera visual lesiones de riesgo, evidencia actual indica que la mayoría de los melanomas son encontrados por los pacientes y sus parejas, lo que puede llevar a un diagnóstico temprano y tratamientos tempranos mejorando el pronóstico sustancialmente (Barton, 2015).

Evidencia reciente indica que la dieta podría jugar un papel en la prevención de esta enfermedad, ya que exposiciones crónicas a radiación UV agota las reservas de antioxidantes en el organismo, por lo tanto se requiere de una dieta apropiada y rica en antioxidantes como: ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), β -carotenos, carotenoides, y otros antioxidantes de origen mineral como el selenio (micronutriente mineral presente en carne y algunos granos). Las sustancias antes mencionadas tienen la función biológica de reducir especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres, así como proteger el ADN del daño causado por estos (Miura y Green, 2015; Russo *et al*, 2015).

4.2.5 Muerte inmunogénica

Algunas terapias contra el cáncer pueden llevar a la célula tumoral a un proceso de muerte donde secreta al medio extracelular o expone en la cara externa de la membrana plasmática moléculas que provocan su reconocimiento y englobamiento por células presentadoras de antígeno, estas moléculas normalmente se localizan en diferentes compartimentos celulares llevando a cabo funciones específicas en la célula y que al ser liberadas (mediante muerte celular, estrés o daño), les permite actuar como señales de daño o alarma que el sistema inmunológico reconoce, estas moléculas son llamadas desde el año 2004, patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o señales de peligro, también conocidas como alarminas (Matzinger P et al., 1994, 2002). La presencia de los DAMPS conduce a la activación de células presentadoras de antígeno y linfocitos T específicos de tumor, estimulando de esta manera al sistema inmunológico (Tesniere A et al., 2008; Keep O et al., 2009a; Krysko D et al., 2012; Kroemer G et al., 2013). Las señales de peligro fueron establecidas por primera vez en 1994 por Polly Matzinger como parte de un modelo propuesto, el cual sugiere que el sistema inmune responde al daño causado por toxinas o daño mecánico donde no hay agentes patógenos presentes. Los DAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que se localizan a nivel de membrana o citoplasma ((receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (nucleotide-binding oligomerization domain receptors) y receptores tipo RIG (Retinoic acid- inducible protein gene)) en las células del sistema inmune innato. Los DAMPs de las células tumorales al ser expuestos en la membrana plasmática o liberados al medio extracelular cumplen una función específica estimulando y facilitando el reclutamiento de células dendríticas específicas del tumor. Logrando una óptima presentación de antígeno a los linfocitos T, activándose la producción y liberación de IL-1 e IFN, efectuando una respuesta celular específica de linfocitos T citotóxicos contra el tumor (Takeda K et al., 2003; Apetoch L et al., 2007; Kono y Rock, 2008; Zitvogel L et al., 2010; Krysko D et al., 2012).

4.2.6 Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)

Las principales proteínas que se han estudiado hasta el momento por participar de manera importante en la muerte inmunogénica de las células tumorales son las que se describen a continuación:

4.2.6.1 Calreticulina

La calreticulina (CRT) aislada por primera vez en 1974 por Ostwald y MacLennan. Se ha encontrado en diferentes especies y en plantas. En los humanos el cromosoma 19 es donde se localizan los genes codificantes de calreticulina. Es una proteína soluble localizada en el lumen del retículo endoplásmico. Se caracteriza por ser una proteína altamente conservada de 46 kDa conformada por tres dominios: globular amino-terminal dominio-N que se une a dominios ricos en carbohidratos, dominio central-P rico en prolina que se pliega en un “brazo extendido” que interactúa con ERp57 (endoplasmic reticulum resident protein 57); y un dominio-C ácido carboxil-terminal de unión a calcio (Panaretakis T *et al.*, 2008).

Se le han encontrado diferentes funciones en la célula donde tiene funciones como reguladora del transporte nuclear, proliferación celular y migración, pero su función principal es en el retículo endoplásmico como chaperona en el plegamiento de proteínas y regulación de la homeostasia del Ca^{2+} (Michalak M *et al.*, 1999).

Otra función extracelular importante es participar en la muerte inmunogénica de las células tumorales. Durante la muerte inmunogénica, la calreticulina es una de las primeras proteínas que se transloca a la membrana plasmática de la célula donde es expuesta en su cara externa dando la señal “cómeme”, aumentando de esta manera la inmunogenicidad de la célula al permitir la atracción de células presentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas y macrófagos, que sean positivas para el receptor CD91 permitiendo el reconocimiento de la calreticulina y el englobamiento de estas células estimulando la fagocitosis (Obeid M *et al.*, 2007c).

Se ha descrito que la exposición de calreticulina durante la muerte inmunogénica es crucial para el reconocimiento de las células que exponen la calreticulina por el sistema inmune para su destrucción. Esto fue comprobado por Michel Obeid y colaboradores, determinando que la exposición de calreticulina dicta la inmunogenicidad de las células tumorales, utilizando células CT26 de cáncer de colon de ratón que fueron tratadas con diferentes tipos de quimioterapéuticos de la familia de las antraciclinas y radiación gamma, observando que estos tratamientos inducían la translocación de CRT en un promedio de tiempo de una hora. El bloqueo de la exposición de calreticulina por medio de RNAs cortos de interferencia fue suficiente para inhibir la fagocitosis de las células tumorales previamente tratadas con antraciclinas inhibiendo de esta manera la inmunogenicidad de las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, cuando a estas células se les administraba calreticulina recombinante esta era absorbida en la superficie celular restaurando la inmunogenicidad de las células tumorales. En el modelo *in vivo* los ratones fueron inyectados de forma subcutánea con células tumorales tratadas *in vitro* con antraciclinas y retados una semana después con células tumorales viables de la misma línea, observando que no había formación de tumor, sugiriendo que la exposición de calreticulina por las células tumorales determina la activación de la respuesta inmune contra el tumor (Obeid M et al., 2007a, 2007b).

Se ha estudiado el mecanismo de translocación de la calreticulina a la membrana plasmática para poder activarlo en diferentes líneas de cáncer y con quimioterapéuticos que se han reportado como no inmunogénicos, como la mitomicina C y el etopósido. Se describió que la translocación de calreticulina del retículo endoplásmico a la membrana plasmática se relaciona con la fosforilación de eIF β α (eukaryotic initiation factor 2). Sin embargo, puede ser desfosforilada por la unión de la subunidad catalítica PP1 (protein phosphatase 1) y del adaptador GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 34), por lo que se usan bloqueadores químicos como tautomicina o caliculin A para inhibir PP1 y salubrinal para inhibir GADD34 en conjunto a quimioterapias reportadas como no inmunogénicas, permitiendo la exposición de calreticulina sin efectos citotóxicos mayores para las células (Obeid M et al., 2007a, 2007b; Kepp O et al., 2009b).

Para que se lleve a cabo la translocación de la calreticulina a la membrana plasmática se realiza en conjunto con proteínas del retículo endoplásmico principalmente de ERp57. Indicando que células tumorales que tengan alguna falla en el mecanismo de translocación ya sea de calreticulina o de ERp57 hace a la célula tumoral resistente a la terapia con antraciclinas inhibiendo la activación de una respuesta inmune antitumoral (Panaretakis T et al., 2008, 2009).

Para la translocación del complejo CRT/ERp57 hacia la membrana plasmática antes de las primeras señales apoptóticas de la célula, se han descrito una vía que puede mediar su exposición. Tras estímulos de estrés al retículo endoplásmico, hay activación de PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase) que conduce a la fosforilación de eIF β , seguido de la activación parcial de caspasa 8, conduciendo al rompimiento de la proteína BAP31 del retículo endoplásmico y a la activación de Bax y Bak. Finalmente, la calreticulina es transportada en vesículas desde el aparato de Golgi, para ser secretada mediante exocitosis de manera dependiente de las proteínas SNARE, conduciendo finalmente a la exposición de ecto-calreticulina en la superficie de la membrana plasmática (Panaretakis T et al., 2009; Zitvogel L et al., 2010).

4.2.6.2 Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (HSPs), son proteínas altamente conservadas cuya expresión puede ser inducida por diferentes tipos de estrés. Fueron descubiertas en 1962 y se han clasificado en cinco familias de acuerdo a su tamaño molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 (Krause y Rodríguez-Krause., 2011). Los dos miembros de esta familia con funciones inmunogénicas son HSP70 y HSP90 (Tesniere A et al., 2007; Keep O et al., 2009; Wells y Malkovski., 2000).

En condiciones normales están constitutivamente presentes en las células cumpliendo su función como chaperonas. La principal función de las proteínas de choque térmico como chaperonas es asegurar el correcto plegamiento de proteínas en condiciones de estrés. Las proteínas de choque térmico se sobreexpresan cuando las células sufren hipotermia, cambio de pH, hipoxia o algún otro tipo de estrés. Se encuentra generalmente en el compartimiento intracelular donde cumplen otras funciones como

inhibir la apoptosis en múltiples niveles, pero estas proteínas se pueden translocar a la cara externa de la membrana citoplasmática donde son expuestas en la superficie o pueden ser liberadas al medio extracelular pudiendo activar de esta manera células presentadoras de antígeno que las reconozcan y activar una respuesta inmune específica (Seigneuric R et al., 2011).

Se ha reportado a la proteína HSP70 como un regulador negativo de la apoptosis inhibiendo el estrés inducido a la célula, previniendo la permeabilización de la membrana mitocondrial a través del bloqueo de la translocación de Bax y mediante la interacción con las proteínas AIF (apoptosis inducing factor) y Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Igualmente se ha reportado que HSP90 puede inhibir la apoptosis como resultado de un efecto negativo sobre la oligomerización de Apaf-1 e inhibe el reclutamiento de procaspasa 9. La familia de proteínas HSP90 está conformada por dos miembros HSP70 y HSP90 y está asociada con proteínas de señalización y ligandos dependientes de factores de transcripción permitiendo la maduración conformacional de estas proteínas (Schmitt E et al., 2007).

Se ha encontrado sobreexpresión de HSP70 en cáncer de mama, del endometrio y gástrico. Además, se ha relacionado con metástasis, pobre pronóstico de curación y resistencia a quimioterapia o radiación. La disminución en la expresión de HSP70 incrementa la sensibilidad de las células tumorales a los tratamientos, in vivo se ha observado que una baja en la producción de HSP70 disminuye significativamente la tumorigenicidad (Nylandsted J et al., 2000; Gurbuxani S et al., 2001). HSP90 se ha encontrado sobreexpresada en cáncer de mama, pulmón, leucemias y enfermedad de Hodgkin's. En cáncer de mama la sobreexpresión de HSP70 y HSP90 se relaciona con un mal pronóstico de la enfermedad (Whitesell L et al., 2005; Neckers L., 2002).

Por otro lado, diferentes estudios han mostrado la importancia de la expresión de las proteínas de choque térmico y el incremento de la inmunogenicidad de las células tumorales que las expresan. Pueden ser reconocidas por receptores que se encuentran presentes en células dendríticas, principalmente de tipo Toll (TLR2 y TLR4) y por el receptor RAGE (receptor for advanced glycation end products), activando la maduración de estas células, lo cual facilita el procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos T (Tesniere A et al., 2008; Keep O et al.,

2009).

Se ha descrito que las proteínas HSP70 y HSP90 pueden influir aumentando la inmunogenicidad de las células tumorales, describiendo tres posibles alternativas:

- . Las proteínas de choque constituyen una señal de peligro para el sistema inmune, ya que se ha observado que HSP70 posee efectos modulatorios directos sobre células inflamatorias.
- . Las proteínas de choque térmico liberadas por las células tumorales en proceso de muerte pueden transferir péptidos antigénicos a células presentadoras de antígeno, las cuales van a activar linfocitos T específicos.
- . Las proteínas de choque térmico pueden aumentar la capacidad de las células tumorales a procesar y presentar antígenos tumorales endógenos directamente a células T específicas del tumor (Figura 5) (Wells y Malkovski., 2000). Por ejemplo, en 1998 Melcher y colaboradores describieron que el incremento de la proteína HSP70 inducida por un tipo de muerte no apoptótico puede dar una señal inmunoestimuladora *in vivo*, colaborando en el desarrollo de una respuesta inmune hacia las células tumorales en lugar de tolerancia inmunológica (Melcher A et al., 1998). Menoret y colaboradores reportaron que la inmunización de modelos murinos con proteínas HSP purificadas de tumores inmunogénicos protegió a los animales del reto con la inmunización de las células tumorales viables de donde se purificaron las proteínas HSP. Igualmente comprobaron que la forma inducida de HSP70, pero no la forma constitutiva HSC70 (Proteína cognato de shock térmico 70), está involucrada en la inmunogenicidad de los tumores. Esto fue observado usando un modelo de carcinoma de colon de rata donde se utilizaron diferentes clonas tumorales y evaluaron parámetros inmunológicos y secreción de HSP70 y HSC70 (Ménoret A et al., 1995).

4.2.6.3 Proteína de alta movilidad caja 1 (HMGB1)

La familia de proteínas del grupo de alta movilidad (HMGB), es la más abundante en cuanto a proteínas HMG, está conformada por cuatro miembros (HMGB1, HMGB2, HMGB3, HMGB4). La proteína HMGB1 es altamente conservada y la que tiene mayor

expresión de todos los miembros de la familia HMG, en humanos está conformada por 215 aminoácidos y forma dos dominios de unión al DNA nombrados como caja A (9-79 aminoácidos) y B (95-163 aminoácidos) y posee una región C-terminal también conocida como cola ácida (186-215 aminoácidos) (Yang H et al., 2013).

HMGB1 posee una homología del 99% entre roedores y humanos, solamente la parte C- terminal de la proteína contiene dos aminoácidos que difieren entre humanos y ratones. HMGB1 puede movilizarse entre el núcleo y el citoplasma y normalmente se acumula en el núcleo donde se une a la cromatina. HMGB1 es la proteína con mayor movilidad en el núcleo, debido a su alta movilidad puede ser encontrada en el citosol (mitocondria, lisosoma, membrana celular y espacio extracelular). La localización de la proteína va a depender del tipo de célula, tejido o señales de estrés. La expresión nuclear de HMGB1 está implicada en varios eventos como replicación del DNA, reparación, recombinación, transcripción y estabilidad genómica. Además de otras funciones que puede tener a nivel extracelular en la inflamación, inmunidad, proliferación celular y muerte celular (Kang R et al., 2014).

Su expresión se lleva a cabo en todas las células nucleadas, así como en células del sistema inmune de la línea mieloide y células NK y representa la proteína no histona más abundante. Es liberada al espacio extracelular por células que se encuentran en fase de necrosis primaria o secundaria. A nivel extracelular la proteína HMGB1 juega un papel importante como señal de peligro (DAMP) que puede montar respuestas inmunes, ya que puede interactuar con los receptores TLR2, TLR4, TLR9 y RAGE presentes en células presentadoras de antígenos. HMGB1 activa la liberación de citocinas proinflamatorias por las células presentadoras de antígeno al interactuar principalmente con el receptor TLR-4, igualmente se puede unir a receptores RAGE modulando funciones en células endoteliales y tumorales (Figura 6) (Bianchi M., 2007).

Para montar una eficiente respuesta inmune contra las células tumorales se requiere del receptor TLR4 y de la proteína MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88). Esto fue comprobado utilizando la transferencia adoptiva de células dendríticas que expresan el receptor TLR4 previamente activadas con células tumorales muertas en ratones con deficiencia de expresión del receptor TLR4,

observando que la terapia restauró la respuesta inmune, concluyendo la importancia del receptor TLR4/MyD88 en la muerte inmunogénica. La activación de la vía TLR4/MyD88 provocado por la unión de HMGB1 inhibe la fusión entre fagosomas y lisosomas facilitando el procesamiento y presentación del antígeno tumoral que es esencial para la estimulación de una respuesta anticáncer (Yamazaki T et al., 2014).

La reducción de HMGB1 en las células MCA205 (fibrosarcoma murino) empleando RNA cortos de interferencia específicos disminuye la inmunogenicidad de estas células. Esto fue comprobado en un modelo murino donde se inoculó de manera subcutánea las células MCA205 que expresaban HMGB1 y células MCA205 en las que estaba bloqueada la expresión de HMGB1, ambas previamente tratadas con doxorubicina, diez días después fueron retados con células viables y sin transfectar de la línea MCA205, los ratones fueron monitoreados cada tercer día para evaluar la formación de tumor, concluyendo que el grupo que recibió la vacuna con células MCA205 tratadas con doxorubicina y que expresaban HMGB1 reducían la progresión del tumor, mientras que el grupo vacunado con células MCA205 tratadas con doxorubicina pero que había sido bloqueada la expresión de HMGB1, fallaban en prevenir la formación de tumores (Yamazaki T et al., 2014).

Se han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen que codifica para TLR4, asociándose la presencia del SNP Asp299Gly en el gen de TLR4 con el fallo en la unión de HMGB1 a dominios extracelulares del receptor TLR4, por lo que no ocurre la activación de la célula dendrítica. Esto se comprobó en 280 mujeres que presentaban cáncer de mama con desarrollo en nódulos linfáticos y que fueron tratadas con cirugía, seguido de terapia adyuvante con irradiación y quimioterapia con antraciclinas. Fue genotipificado TLR-4 y analizado en términos de progresión o disminución tumoral después de la terapia, encontrando mayor prevalencia del SNP Asp299Gly en estas pacientes (Apetoh L et al., 2007b).

4.2.6.4 Adenosin trifosfato (ATP)

La adenosina trifosfato (ATP) es un nucleótido trifosfato que proporciona energía a la célula, se compone de adenosina y tres grupos fosfato. La liberación de ATP por las

células es un evento que puede ocurrir cuando la célula recibe estrés, daño físico o químico. Durante la muerte inmunogénica ocurre la secreción de ATP en etapas tempranas de muerte celular, posterior a la exposición de CRT en la cara externa de la membrana plasmática. Es el más abundante metabolito intracelular, considerado el más importante quimioatrayente de monocitos que median la limpieza de los cuerpos apoptóticos. Cuando es secretado por la célula en proceso de muerte hacia el espacio extracelular es reconocido por los receptores purinérgicos inotrópicos P2X o metabotrópico P2Y, los cuales son abundantemente expresados en células del sistema inmune incluyendo macrófagos y células dendríticas (Kroemer G et al., 2013).

Los receptores purinérgicos se clasifican en P2X y P2Y. Los receptores inotrópicos (P2X) son de tipo canales iónicos activados por ligando. Se han identificado siete receptores de este tipo que van de P2X1 a P2X7. Este tipo de receptores se expresan principalmente en el sistema nervioso, plaquetas y células del musculo liso. Los receptores P2Y o conocidos como receptores metabotrópicos que provienen de la familia de receptores acoplados a proteína G, hasta el momento se han identificado ocho receptores de este tipo (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14). Se expresan en una amplia variedad de tejidos (Yang G et al., 2014).

Se ha reportado que el ATP extracelular es reconocido por los receptores P2X, principalmente por P2RX7, los cuales están conformados por dos dominios transmembrana y un largo bucle extracelular con la habilidad de unirse al ATP. En respuesta a la unión del ATP al receptor presente en las células presentadoras de antígeno, hay una abertura de los canales que produce el flujo de iones de calcio y potasio, conduciendo a la despolarización de la membrana plasmática, lo que provoca la activación del inflammasoma, el cual es descrito como un sensor para patógenos o alarminas en respuesta a la señal de peligro. El receptor NLRP3 (NOD- like receptor family, pyrin domain containing 3) interactúa con la proteína ASC (Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A CARD) formando el inflammasoma, principal complejo activador de caspasa-1. La activación de caspasa-1 es requerida para estimular la maduración proteolítica de pro- IL-1 y la subsecuente secreción de IL-1 e IL-18 al medio extracelular. La IL-1 al ser liberada por la célula presentadora de antígeno contribuye a la activación de linfocitos T citotóxicos (CD8+) específicos del

tumor que producen IFN- γ contra las células tumorales (Ghiringhelli F et al., 2009; Ferrari D et al., 2016).

Se ha determinado que distintos tratamientos anticáncer pueden inducir la liberación de ATP por las células tumorales, sin embargo, cuando no se forma el inflamasoma conduce a falla en la activación de una respuesta inmune antitumoral. Esto se comprobó con células tumorales de la línea EL4 que no presentaban Casp-1 y NLRP3, que son componentes del inflamasoma. Estas células fueron implantadas en ratones y se observó que no respondieron al tratamiento con oxaliplatino por lo que se concluyó que la actividad anti-tumoral del oxaliplatino depende de la formación del inflamasoma (Ghiringhelli F et al., 2009).

En otro experimento se observó que el bloqueo de los receptores purinérgicos empleando inhibidores de ATP, o la depleción de ATP en células de cáncer de colon de ratón (CT26) tratadas con doxorrubicina o mitoxantrona inhibe la capacidad de estos tratamientos de proteger contra la formación de tumores cuando estos ratones fueron retados con las células CT26 viables (Ghiringhelli F et al., 2009).

La liberación de ATP por las células puede ocurrir a través de una variedad de mecanismos: exocitosis en vesículas, secreción de ATP del citoplasma a través uniones gap, canales de panexina y transportador ABC (del inglés ATP binding cassette (Kroemer G et al., 2013)). De acuerdo a reportes, la autofagia es otro mecanismo que facilita la liberación de ATP por las células en proceso de muerte. Se trata de una serie de pasos en los cuales el material citoplasmático de la célula es secuestrado dentro de autofagosomas para luego fusionarse con lisosomas y mediante hidrolasas degradar el material celular para ser reciclado a través del metabolismo energético o reacciones anabólicas. Se ha descrito que la inhibición genética de reguladores de autofagia (Atg5, Atg7, Atg10, Atg12, Beclin 1, Lamp2, Vps34) o el uso de inhibidores farmacológicos (bafilomicina A1 o 3-hidroxicloroquine) reduce considerablemente la secreción de ATP por la célula en proceso de muerte y como consecuencia es suprimida la inmunogenicidad de la misma. Se observó que la autofagia es necesaria en las células tumorales tratadas con quimioterapia para que ocurra una óptima liberación de ATP. Las células tumorales que no presentaron activación de autofagia manifestaron deficiente liberación de ATP *in vivo*, lo cual se

correlacionó con la insuficiente activación de células presentadoras de antígeno y la ausencia de activación de una respuesta inmune antitumoral (Michaud M et al., 2011; Martins I et al., 2014).

4.2.7 Inductores de muerte inmunogénica

Mientras algunos quimioterapéuticos causan una muerte celular que no es inmunogénica, otros quimioterapéuticos pueden favorecer la activación de células efectoras del sistema inmune mientras inducen muerte celular. La muerte inmunogénica puede ser inducida por diversas modalidades terapéuticas que se han clasificado en tipo I y tipo II de acuerdo al mecanismo de daño que inducen en las células tumorales.

Los de tipo I se caracterizan por ser su blanco proteínas del citoplasma, proteínas transmembranales o proteínas nucleares como el DNA y proteínas reparadoras. El efecto producido sobre estas proteínas provoca un daño colateral al retículo endoplásmico por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este grupo se clasifican a los quimioterapéuticos como mitoxantrona, antraciclinas, oxaliplatino y ciclofosfamida, además de otras terapias con glucósidos cardíacos, vorinostat, shikonin, bortezomib y la radiación ultravioleta.

Las terapias del grupo II se caracterizan por tener como blanco el retículo endoplásmico, entre los cuales tenemos la terapia fotodinámica con hipericina y Cocksackievirus B3 (Dudek A et al., 2013; Inoue H et al., 2014; Pol J et al., 2015; Bezu L et al., 2015).

4.3.-DICLOROACETATO DE SODIO (DCA-Na)

El DCA-Na es una sal empleada en dosis terapéuticas para el tratamiento de diferentes padecimientos metabólicos y cardíacos. El sitio de acción de esta molécula es el complejo de enzimas piruvato deshidrogenasa, localizado en la membrana interna de la mitocondria, este complejo enzimático es responsable de catalizar la descarboxilación reversible del piruvato a acetil coenzima A, el cual es un paso limitante para la oxidación aeróbica de la glucosa, piruvato y lactato (Stacpoole, *et. al.*, 1989; Sierra-Rivera, 2011).

4.3.1.-GLICÓLISIS Y EL EFECTO WARBURG

En presencia de oxígeno, el tejido diferenciado no proliferativo (sano), metaboliza la glucosa a piruvato por la vía de la glicólisis y posteriormente se oxida la mayoría del piruvato en la mitocondria a CO₂ durante el proceso de la fosforilación oxidativa, ya que el oxígeno es el aceptor final de electrones requerido para oxidar completamente la glucosa, la presencia del oxígeno es de vital importancia (**Fig. 1**). En situación de hipoxia (baja concentración de oxígeno) el piruvato generado en la glicólisis es desviado hacia la generación de lactato, por medio de glicólisis anaeróbica, esto permite la circulación de NADH a NAD⁺ (y permite continuar la glicólisis), pero resulta en una mínima producción de ATP, en comparación a la fosforilación oxidativa. En las células neoplásicas la glucosa se desvía a un metabolismo por vía de glicólisis aeróbica, esto es fermentando la glucosa a lactato aún en presencia de suficiente oxígeno para soportar la fosforilación oxidativa, esto se conoce como efecto Warburg, y es una característica metabólica presente en las células neoplásicas (Vander-Heiden, *et. al.*, 2009; Hsu PP y Sabatini DM, 2008; Kankotia S y Stacpoole PW, 2014).

Por su actividad sobre vías metabólicas de la mitocondria el DCA-Na ha sido sujeto de estudios en células neoplásicas, se comprobó su actividad citotóxica dependiente de dosis por inducción de apoptosis a dosis de 300 a 750 mM/mL, corroborado por TUNEL y tinción con naranja de acridina. En este estudio también se observó una reducción en la capacidad de invasión celular dependiente de la dosis. Así como también un efecto de inhibición de estructuras pro-angiogénicas (Franco-Molina, *et. al.*, 2012).

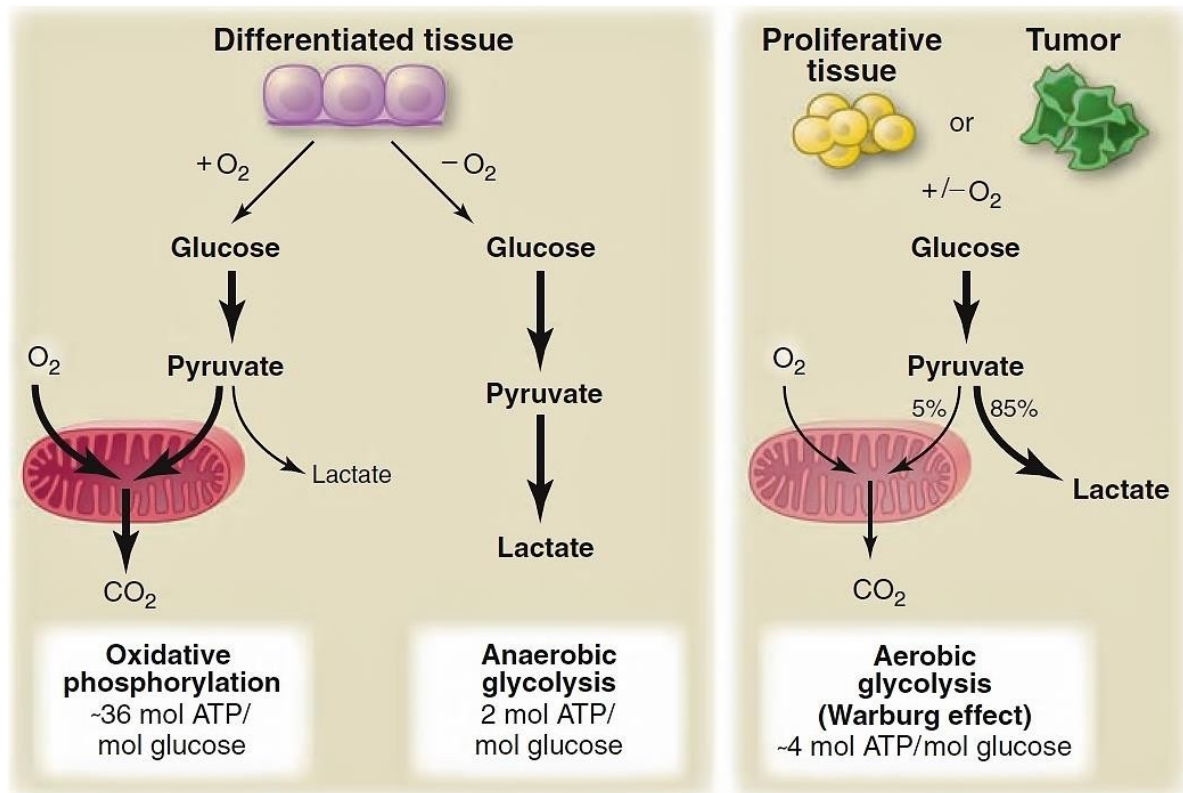


Figura 1.- Imagen comparativa del metabolismo de la glucosa en tejido diferenciado sano, en presencia de oxígeno la glucosa sigue una vía de fosforilación oxidativa, mientras que en niveles bajos de oxígeno toma lugar una glicólisis anaeróbica. Se destaca el hecho de que en el tejido proliferativo, la glucosa siempre se desvía al fenómeno conocido como efecto Warburg. (Hsu *et al.*, 2008)

4.4.-PLATA COLOIDAL (AgC)

La plata es un metal ampliamente encontrado en los ambientes humanos, bajas concentraciones de este metal en forma de partículas ingresa al cuerpo por inhalación de aire, es también ingerido en alimentos y agua. Actualmente su uso se ha incrementado en productos de desinfección, artículos médicos (catéteres, sutura quirúrgica, rellenos odontológicos, prótesis cardiovasculares, etc.), textiles, cosméticos, e inclusive productos de higiene personal. La plata metálica es inerte ante tejidos orgánicos, sin embargo, en presencia de humedad, fluidos corporales y secreciones, libera el ion Ag^+ biológicamente activos, que muestran fuerte afinidad por grupos sulfhídricos y otros ligando anicónicos y membranas celulares. Su actividad antibacterial y antifúngica se fundamenta en la absorción de estos iones al interior de las células por medio de pinocitosis, subsecuentemente desnaturaliza e inactiva proteínas y enzimas esenciales para la actividad metabólica celular (Lansdown, 2010; Hatipoglu MK *et al*, 2015).

Evidencia reciente indica que partículas de AgC por su actividad inhibidora de la cadena respiratoria lleva a producción de ROS provocando un importante efecto de estrés oxidativo (Guo D. *et al*, 2015).

En estudios anteriores se ha demostrado la capacidad de la plata coloidal o nanopartículas de plata para inducir un efecto citotóxico sobre células de líneas tumorales dependiente de dosis, por medio de la alteración de la cadena respiratoria lo que amplifica la producción de especies reactivas de oxígeno, y al mismo tiempo interrumpiendo la síntesis de ATP (Dawei *et al*, 2016).

Así mismo, se demostró que los tratamientos con plata coloidal reducen la actividad de la lactato deshidrogenasa, resultando en una disminución de NADH/NAD⁺, provocando una muerte celular por vía apoptótica debido a la reducción del potencial de membrana de la mitocondria (Franco-Molina, *et. al.*, 2010).

En la línea tumoral de cáncer de mama MCF-7 la plata coloidal induce muerte celular por apoptosis en ensayos *in vitro*, en donde se encontraron como DL₅₀ y DL₁₀₀, las dosis de 3.5 ng/mL y 14 ng/mL, respectivamente y la viabilidad de las células de mono nucleares de sangre periférica (PBMC) no resultó afectada bajo las dosis antes mencionadas (Franco-Molina, *et. al.*, 2010).

En otro estudio empleando la línea celular de cáncer B16F10 se produjo un efecto citotóxico dependiente de dosis, de 7 a 17.5 µg/mL, además en este estudio se utilizó un modelo murino para demostrar el valor terapéutico del tratamiento con plata coloidal. Los modelos experimentales fueron tratados diariamente con una dosis de 28 mg/kg de plata coloidal por vía subcutánea alrededor del tumor, encontrando que el volumen tumoral reduce significativamente (0.85 ± 0.64 g) cuando se compararon con el grupo control. Adicionalmente este tratamiento previno metástasis hacia músculos, cavidad peritoneal, intestinos e hígado (Sierra-Rivera, *et. al.*, 2013).

5.- MÉTODOS

5.1.-CULTIVOS CELULARES

Se utilizó la línea celular de cáncer murino B16F10 de American Type Culture Collection (Manassas, VA. USA). La cual fue cultivada en medio Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM-F12) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, inactivado a 56°C durante 30 minutos (GIBCO, Grand Island, N.Y. USA), conteniendo 3 mL de penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO. USA). La línea celular se mantuvo en incubación en una atmósfera de 37°C, con 95% de aire y 5% de CO₂.

5.2.-VIABILIDAD CELULAR

La línea celular de cáncer B16F10 fue sembrada a una concentración de 5×10^3 células/pozo empleando placas de 96 pozos de fondo plano e incubando durante 24 h a 37 °C a 95% de aire y 5% de CO₂. Después de la incubación se retiró el medio de cultivo. Los tratamientos se añadieron en rangos: para el DCA-Na de 15 a 300 mM/mL; para AgC de 0.87 µg/ml a 7 µg/ml; Posteriormente se incubaron durante 4 horas a 37 °C a 95% de aire y 5% de CO₂. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron con medio DMEM/ F-12. La viabilidad celular se determinó por el método resazurin (Alamar Blue), y la citotoxicidad se expresó como la concentración de inhibición del crecimiento celular del 50% (LD₅₀). Los resultados se dieron como la media de tres experimentos independientes. El LD₅₀ de cada tratamiento se usó en experimentos adicionales.

5.3.-DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR

Para la determinación de la muerte celular se siguió la metodología descrita por Rodríguez-Salazar *et al.* Brevemente, las células B16F10 (1×10^5) Fueron sembradas en placas de 12 pocillos y cultivadas durante la noche a 37 °C a 95% de aire y 5% de CO₂. Las células se trataron con Ag (LD₅₀) o DCA (LD₅₀) o una combinación durante 5 horas. Después de tratamiento, se recogieron las células y se lavaron con solución salina taponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en 100 µl 1x binding buffer (0.1M Hepes pH 7.4, 1.4M NaCl, and 25mM CaCl₂; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) suplementado con Anexina V conjugada con APC (5µg/ muestra) y yoduro de propilio (1µg/ muestra), incubados a 4 °C y manteniéndose en la oscuridad por 15 minutos. El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro Accuri C6; para el análisis de datos se utilizó el software BD Accuri C6 versión 1.0.264.21.

5.4.-ANIMALES

Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 DE 6-10 semanas con un peso corporal de alrededor de 23 +/- 2 g. de los laboratorios Harlan (Ciudad de México, México). Los ratones se mantuvieron a 25.29 ° C y un ciclo de 12 horas de luz a 12 horas de oscuridad. Se proporcionaron alimentos y agua *ad libitum*. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Revisión de ética para la experimentación Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.5.-ADMINISTRACIÓN DEL TRATAMIENTO E IMPLANTACIÓN DE TUMORES

Los tumores se indujeron por vía subcutánea inyectando células B16F10 en 200 µgl de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Siete días después del trasplante de células B16F10, apareció una masa tumoral notable y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos (cinco ratones por grupo). El grupo de control recibió solo solución salina. El grupo de DCA recibió 59 mg/kg de DCA, mientras que el grupo de Ag recibió 28mg/kg de Ag. Los tratamientos fueron administrados por vía peritumoral, diariamente por 21 días. Finalmente, el grupo Ag+DCA recibió las mismas dosis de Ag y DCA por vía peritumoral cada dos días, alternando entre tratamientos. La longitud y el ancho del tumor se midieron semanalmente y el volumen del tumor se determinó usando la ecuación $L \times W^2$, donde L es el lado largo y W es el lado más corto. Los animales se sacrificaron en el punto final del estudio (21 días) y los tumores se extirparon para experimentos adicionales.

5.6.- ELISA PARA SUBUNIDAD ACTIVA NF- κ B P65

Para medir la activación de la subunidad NF- κ B, se prepararon extractos nucleares a partir de células tumorales, utilizando un kit de extracto nuclear de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de concentraciones de p65 nuclear se determinaron mediante un ensayo ELISA sensible (TRANS-AM, Active Motif, Rixensart, Bélgica).

5.7.- PRODUCCIÓN DE TNF- α Y NO

Los tumores se maceraron con RPMI y el sobrenadante se recogió y se ajustó a una concentración de proteína mediante BSA y se almacenó a -20 ° C para su evaluación. El TNF- α se midió en el sobrenadante del tumor mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (kit ELISA de ratón TNF- α ; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific; Viena, Austria). Todos los procedimientos de ensayo se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Se utilizó el kit de ensayo de nitrato / nitrito para medir los niveles de NO en los homogeneizados de tejido del tumor siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (kit de ensayo colorimétrico de nitrato / nitrito; Cayman Chemical, EE. UU.).

5.8.- INMUNOCITOQUÍMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE HM/GB1, HSP70 Y HSP90

Células (100×10^3 células/pocillo) se sembraron en cubreobjetos de vidrio a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Después de esto, las células se trataron con Ag LD₅₀ (2.8×10^{-5} mN), DCA LD₅₀ (195 mN) o Ag+DCA LD₅₀ (2.8×10^{-5} mN y 135 mN, respectivamente) a 37° C y 5% CO₂ durante 4 horas. Posteriormente las células se fijaron con metanol, se bloquearon con suero de caballo normal (2.5%) (Vector Laboratories, ABC Kit) durante 20 minutos y se incubaron durante 4 horas con anticuerpos monoclonales de ratón de Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EE. Sc-56698), HSP70 (sc24) o HSP90 (sc-7947), todos usados en una dilución 1:1000. Luego, ñas células se incubaron con IgG anti-ratón / conejo biotinilada con HRP (Vector Laboratories, ABC Kit) durante 1 hora y solución de Avidin-DH (Vector Laboratories ABC Kit) durante 30 minutos; DAB (3,3 -diaminobencidina) se añadió posteriormente. El cromógeno DAB produce una reacción marrón en presencia de peroxidasa (HRP). Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron en una gradiente de alcohol-xilol y se montaron en Entellan® (resina sintética) sobre portaobjetos de vidrio. Se usaron células B16F10 no tratadas como control de expresión basal HMGB1 , HSP70 y HSP90. La expresión de HMGB1, HSP70 y HSP90 (intensidad de tinción DAB) se realizó utilizando el software Fiji versión 2.0 como lo describe Patera (2019). Los datos se presentan como densidad óptica DAB (= log (intensidadmáxima / intensidad media)) de cinco secciones por portaobjetos. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

5.9.-CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE CALRETICULINA

Células (50×10^3 células / pocillo) se sembraron en ultra-bajo de fijación, las placas de 24 pocillo a 37°C y 5% de CO₂. Después de esto, las células se trataron con Ag LD₅₀ (2.8×10^{-5} mM), DCA LD₅₀ (195 mM) o Ag+DCA LD₅₀ (2.4×10^{-5} mM 135 mM, respectivamente) a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas. Posteriormente, se recuperaron las células y se tiñeron con calreticulin anticuerpo policlonal conjugado con ficoeritrina durante 1 hora a 37 ° C y 5% CO₂. Las células se lavaron con PBS + albumina de suero de bovino (BSA) (1%) y se resuspendió en 200 µl de PBS. Los eventos se adquirieron en el citómetro de flujo Accouri C6 (BD Bioscience, San José, CA, EE.UU.).

5.10.- EXPERIMENTO DE VACUNACIÓN ANTITUMORAL *IN VIVO*

Para la preparación del lisado se siguió el protocolo descrito por Rodríguez-Salazar *et al.* con modificaciones menores. Brevemente, las células B16F10 (5×10^6) fueron tratadas *in vitro* con Ag (LD_{50}) o DCA (LD_{50}) o la combinación de Ag+DCA (LD_{25}) durante 5 horas. Después de esto, las células se centrifugaron a 260 x durante 10 min y se lavaron dos veces con PBS . Finalmente, las células se resuspendieron en 200 μ l de PBS y se inocularon por vía subcutánea en el flanco izquierdo del ratón. Después de 7 días, los ratones fueron desafiados con células B16F10 vivas resuspendidas en 200 μ l de PBS mediante inyección subcutánea en el flanco derecho. La incidencia y el crecimiento de los tumores se midieron todos los días en los dos sitios de inyección durante 30 días con un calibre digital. El volumen tumoral y el ancho del tumor, misma formula que utilizó anteriormente Rodríguez- Salazar.

5.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett. La diferencia estadísticamente significativa se consideró . Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

6.-RESULTADOS

6.1. DCA-Ag DISMINUYÓ LA VIABILIDAD CELULAR DE LAS CÉLULAS DEL MELANOMA B16F10

El tratamiento de Ag o DCA indujo una disminución de la viabilidad celular de las células de B16F10 de una manera dependiente de la dosis en comparación con el control ($p < 0.01$) (Fig.). DL_{25} (2.4×10^5 mM) y DL_{50} (2.8×10^5) se determinaron para Ag (**Fig. 7.**) ; DL_{25} (135 mM) y DL_{50} (195 mM) para DCA. Se requirieron dosis más bajas de Ag y DCA en la configuración combinatoria para lograr DL_{25} y DL_{50} .

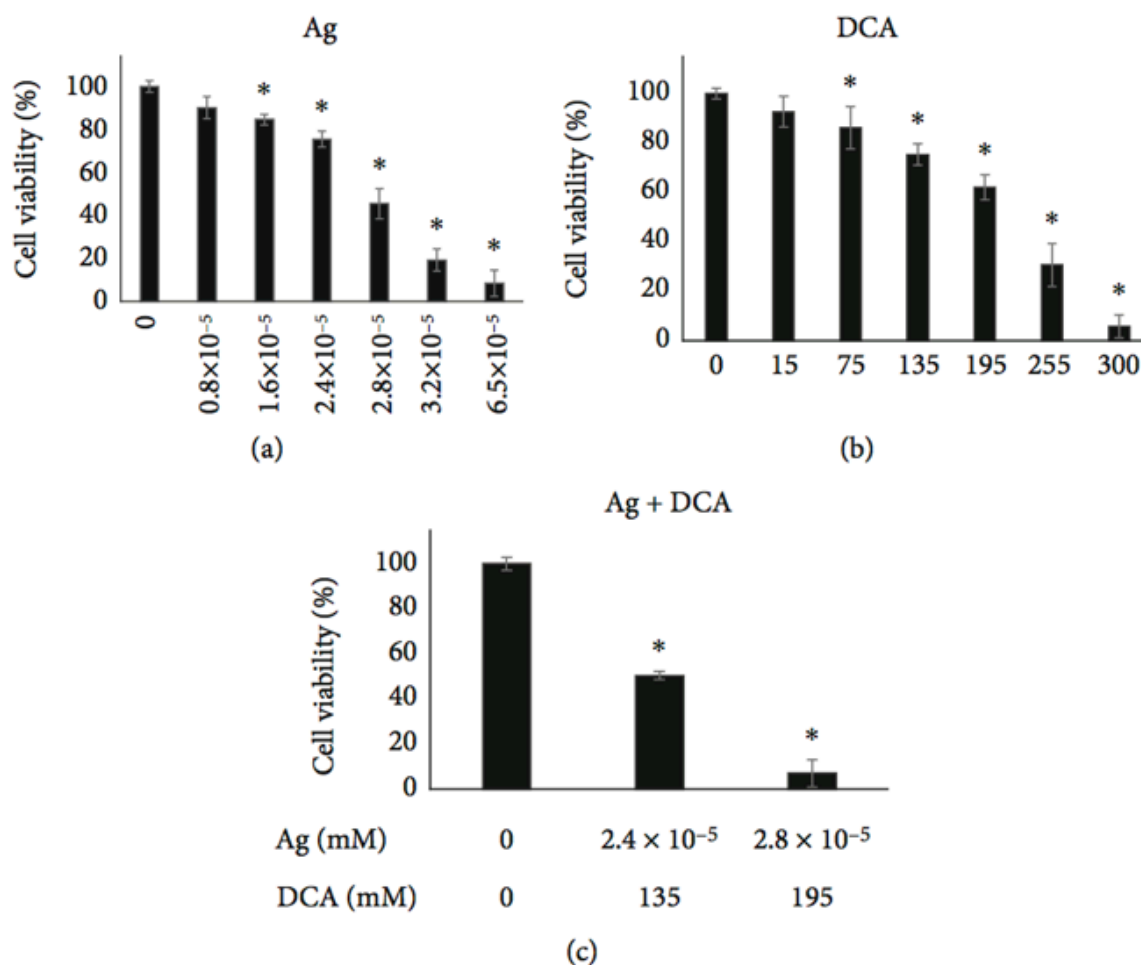


Figura 7.- Viabilidad celular de las células B16F10. Las Células B16F10 se cultivaron en placas de 96 pocillos (5×10^3 células/ pocillo) a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Luego, las células se trataron con Ag (0 - 6.5×10^{-5} mM), DCA(0 -300 mM) o Ag+ DCA (0 - 2.8×10^{-5} mM y 0 -195 mm, respectivamente) durante 4 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de resazurina; brevemente, se retiraron los tratamientos y las células se incubaron con el reactivo de resazurina (20% v/v) durante 1 hora; pasado este tiempo, se determinó la fluorescencia de la resorufina convertida a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. El aumento de la señal fluorescente se cuantificó como viabilidad celular. Las barras del gráfico muestran la media de los tres experimentos independientes. Diferencia estadística ($p \leq 0.05$) se determinó con la prueba de Dunnet de rango post hoc. Existe una diferencia estadística entre el control y las barras marcadas en el gráfico.(*).

6.2. REGRESIÓN TUMORAL INDUCIDA POR Ag - DCA

la administración de Ag, DCA y Ag+DCA indujeron la regresión del volumen del tumor ($p < 0.05$) de una manera dependiente del tiempo, observando un mejor efecto en ratones tratados con Ag+ DCA.

6.3. DISMINUCIÓN DE TNF- α , NF- κ B Y ÓXIDO NÍTRICO CON LOS TRATAMIENTOS DE AG, DCA Y AG+DCA

Todos los tratamientos disminuyeron significativamente ($p \leq 0.05$). la producción de TNF- α (**Figura 8 (c)**), actividad de NF- κ B (**Figura 8 (d)**) y producción de óxido nítrico (NO) en comparación con el grupo control; no se observó una diferencia significativa entre los grupos tratados (**Figura 8 (c) - 8 (e)**).

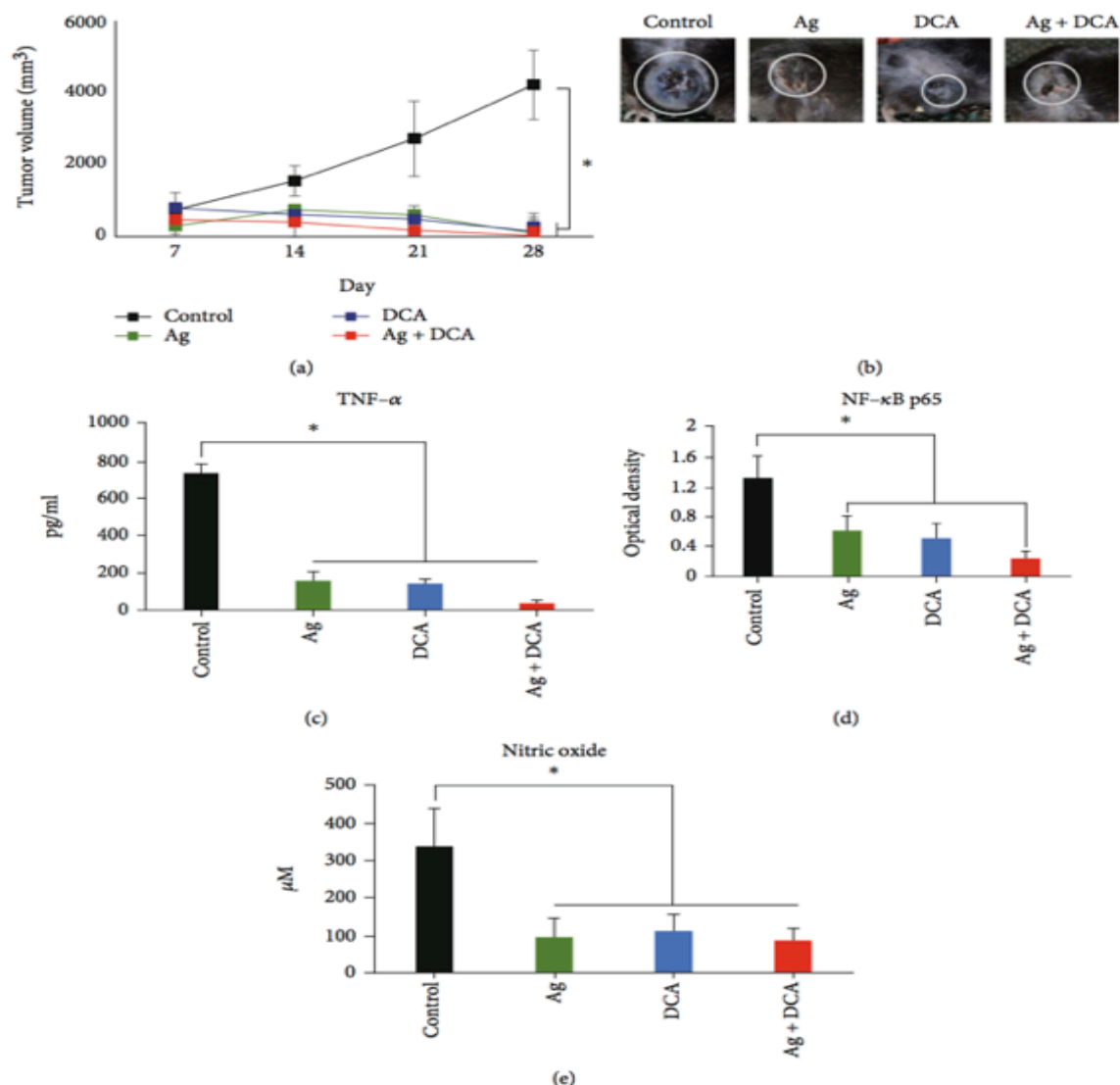


Figura 8.- Regresión tumoral en ratones portadores de melanoma tratados con Ag+ DCA. Células viables B16F10 (0.5×10^6) se inyectaron en el flanco izquierdo de ratones C5BL/6. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos experimentales: no tratados (control) o tratados con Ag (28mg/kg), DCA (500mg/kg) o Ag (28mg/kg)+ DCA (500mg/kg). El crecimiento del tumor se controló diariamente hasta el sacrificio de los ratones y se determinó con la ecuación: volumen del tumor= $(L \times W^2)/2$, donde L es el lado mas largo y W es el lado más corto (a). Se muestran fotografías representativas de tumores o lesiones restantes de ratones de cada grupo (b). La gráfica de barras representa la desviación estándar de TNF- α (c), NF- κ B p65 (d) y niveles de óxido nítrico de tres ratones por grupo. Hay diferencia estadística ($p \leq 0.05$) entre las barras marcadas con (*).

6.4. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE HGMB1, HSP70 Y HSP90 EN CÉLULAS B16F10 TRATADAS CON Ag, DCA O Ag+DCA.

La localización de HGMB1, HSP70 y HSP90 se determinó mediante microscopía (**Figura 9 (a)**). En condiciones de control, HGMB1, HSP70 y HSP90 eran indetectables o estaban localizados en el núcleo (**Figura 9 (a)**). El tratamiento con Ag movilizó HSP70 al citoplasma y a la membrana celular, el tratamiento con DCA movilizó HGMB1 y HSP70 al citoplasma y a la membrana celular, el tratamiento combinado movilizó HGMB1, HSP70 y HSP90 al citoplasma y a la membrana celular (**figura 9 (a)**).

Todos los tratamientos aumentaron significativamente ($p < 0.05$) en la expresión de HMGB1 y HSP70; sin embargo, solo DCA y Ag+ DCA aumentaron significativamente ($p < 0.05$) HSP90, en comparación con el control (células B16F10 no tratadas) (**Figura 9 (b)**).

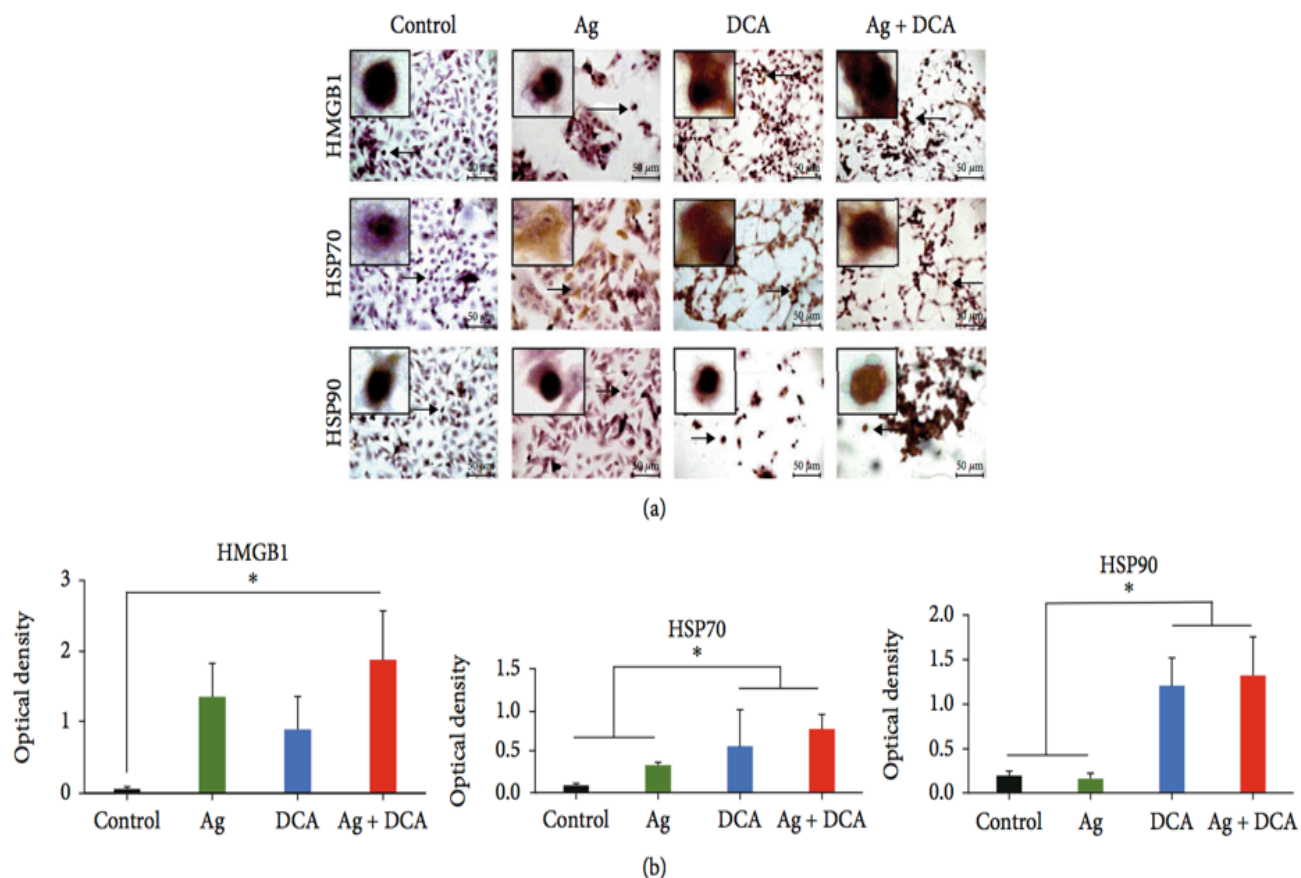
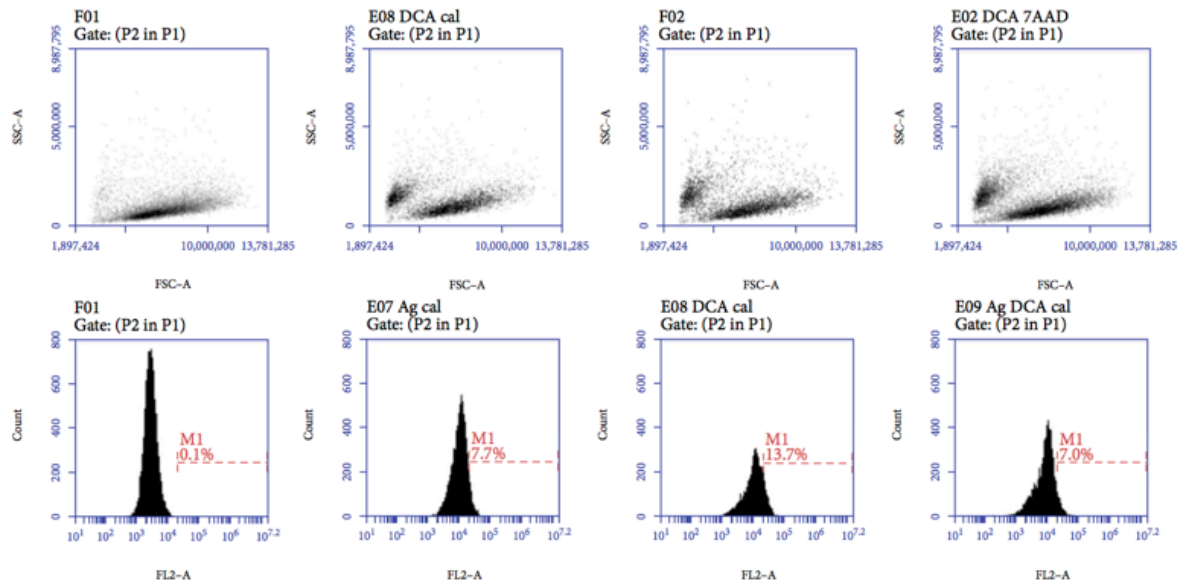


Figura 9.- Inmunocitoquímica de células B16F10. Las células B16F10 se cultivaron en placas de 6 pocillos (100×10^3 células / pocillo) en cubreobjetos de vidrio a 37°C y 5 % de CO_2 durante 24 horas. Luego, las células se trataron con Ag (2.8×10^{-5} mM), DCA (195mM), o Ag+ DCA (2.4×10^{-5} mM y 135 mM, respectivamente) durante 4 horas y se fijaron con metanol al 100%. Se aplicaron anticuerpos primarios para HMGB1, HSP70 y HSP90, seguidos del anticuerpo secundario HRP y el kit de sustrato ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las células se tiñeron por contraste con hematoxilina (Vector), se montaron en portaobjetos y se tomaron imágenes a 40 x. La expresión de proteína positiva se evidencia por la presencia de una mancha marrón en el núcleo celular, el citoplasma o ambos se cuantificaron con el software analizador de imágenes Fiji (ImageJ) versión 2.0. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes (a). No hay diferencia estadística ($p \leq 0.05$) entre las barras etiquetadas con (*) en la gráfica.

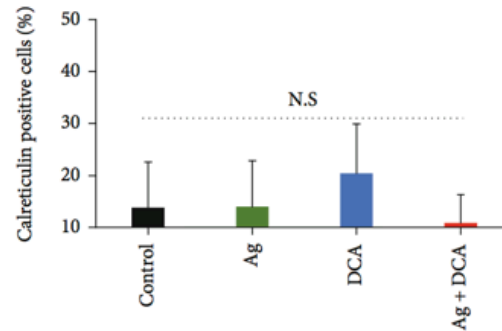
6.5. EXPOSICIÓN A CALRETICULINA EN CÉLULAS TRATADAS CON Ag, DCA O Ag+DCA

Ag, DCA y los tratamientos no inducen la exposición de la superficie a calreticulina en las células B16F10, en comparación con el control (células B16F10 sin tratar) (**Figuras 10 (a) y 10 (b)**).



(a)

Calreticulin



(b)

Figura 10.- Exposición de la superficie de calreticulina en células B16F10. Las células B16F10 se cultivaron en placas de 6 pocillos (100×10^3 células / pocillo) en cubreobjetos de vidrio a 37°C y 5 % de CO_2 durante 24 horas. Luego, las células se trataron con Ag (2.8×10^{-5} mM), DCA (195mM), o Ag+ DCA (2.4×10^{-5} mM y 135 mM, respectivamente) durante 4 horas. La exposición a calreticulina se determinó mediante citometría de flujo. La figura (a) muestra el tamaño frente a la granularidad representativa de la población celular analizada (arriba) y el recuento de células frente a histogramas representativos de intensidad de tinción. (b) Promedio de tinción positiva de tres experimentos independientes. No hay diferencias estadística ($p \leq 0.05$) entre las barras según lo determinado por ANOVA de una vía y la prueba de Tuckey.

6.6. Ag, DCA O Ag+ DCA NO INDUCE LA MUERTE CELULAR INMUNOGÉNICA

Las células B16F10 se lisaron con Ag, DCA y Ag+ DCA y no impiden la implantación de tumores en ratones C57BL/6 (**figura 11 (a) – 11 (b)**).

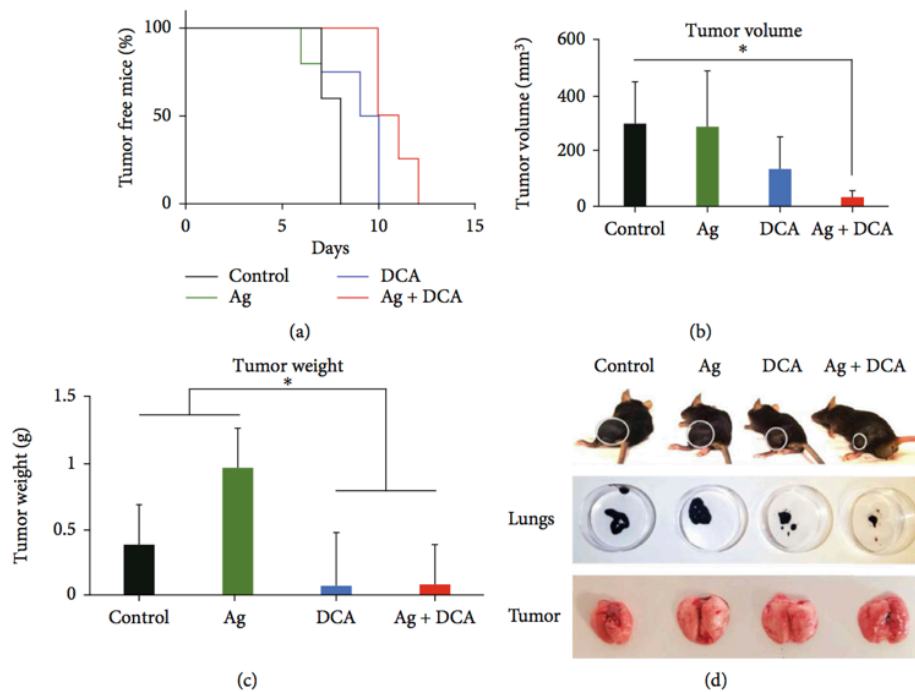


Figura 11.- Implantación de tumores en ratones vacunados. Los ratones C57BL/6 se dividieron aleatoriamente en 4 grupos: ratones sin inmunización (control) y ratones inmunizados con células B16F10 (5×10^6) lisados con Ag (6.5×10^{-5} mM), DCA (300 mM) o Ag+DCA (2.8×10^{-5} mM y 195 mM, respectivamente). Siete días después de la inmunización, los ratones fueron desafiados con células viables B16F10 inyectadas en el flanco izquierdo. El aspecto del tumor se controló diariamente mediante palpación y el día del sacrificio se determinó el volumen del tumor con la ecuación: $\text{volumen del tumor} = (L \times W^2)/2$; donde L es el lado más largo y W el lado mas corto. La imagen muestra el porcentaje de ratones sin tumor (ratones sin tumor) (a), el volumen del tumor (b) y el peso (c) en el día 12 después de la exposición, y un ratón, tumor, pulmones representativos de cada grupo. (d) No hay diferencia estadística ($p \leq 0.05$) entre las barras marcadas con (*) en la gráfica.

7.-DISCUSIÓN

Este estudio está dirigido a determinar si la combinación de sustancias con actividad antitumoral ya demostradas *in vitro* e *in vivo* tienen la capacidad de incrementar su actividad citotóxica antitumoral.

Por lo que se determinó que los tratamientos con DCA-Na, AgC tienen la capacidad de disminuir la viabilidad celular de la línea B16F10 tal como se ha reportado en estudios anteriores (Franco-Molina *et al*, 2006; 2010; 2012).

Cuando se combinaron los tratamientos de DCA-Na, AgC, se concluye que *in vitro* estos compuestos no tienen la capacidad de incrementar su actividad citotóxica sobre la línea B16F10. Se considera para estudios posteriores determinar el efecto antagónico entre sustancias empleando un sistema estadístico basado en un isoblograma, con los datos actuales no se puede determinar esto debido a que se requiere de una curva con rangos más amplios de dosis. A la fecha no se encontró en la bibliografía datos relacionados con estos experimentos.

Es importante denotar que a pesar de que *in vitro* las combinaciones de tratamientos que incluían AgC no fueron citotóxicas, cuando estas fueron administradas en un modelo de melanoma *in vivo* mostraron un efecto antitumoral marcado, mejor que lo obtenido cuando se empleaban los tratamientos sin combinar. Los resultados obtenidos de manera individual *in vivo* empleando AgC concuerdan con los reportado previamente (Sierra-Rivera *et al*, 2015).

En el tratamiento con DCA-Na, así como el combinado, se observó una disminución del volumen tumoral, relativo al grupo control, hacia la segunda semana del experimento. Resultados similares a los encontrados por Franco-Molina *et al* (2012). La molécula de DCA-Na afecta selectivamente a las alteraciones metabólicas mitocondriales de las células tumorales, ya que es capaz de redirigir a la glucosa de una glicólisis aeróbica, conocido como efecto Warburg, hacia la fosforilación oxidativa por medio de la inhibición de la enzima piruvato deshidrogenasa, además, despolariza la membrana mitocondrial de regreso a su potencial normal, esto anterior activa mecanismos de muerte celular y limita el crecimiento tumoral (Tataranni *et al*, 2019).

Se evaluó el efecto citotóxico de la plata coloidal (Ag), el dicloroacetato de sodio (DCA) y su combinación frente a las células de melanoma murino B16F10. Nuestros resultados muestran que Ag tiene efectos antiproliferativos contra las células B16F10, como ya informó nuestro grupo de investigación (Sierra *et al.* 2011). Otros informes sobre la actividad citotóxica de la plata contra células de melanoma se refieren a las nanopartículas de plata, aunque el mecanismo de toxicidad propuesta sigue siendo el mismo (Valenzuela *et al.* 2019) . el DCA también mostró un efecto antiproliferativo contra las células de melanoma. De manera similar, Rivera- Lazarin *et al.* Informó de una disminución de la viabilidad de la dosis en las células B16F10 tratadas con DCA (LazarAA-n *et al.* 2019) .

La actividad citotóxica de Ag y DCA aumentó cuando se usaron como tratamiento combinado. Esto se esperaba ya que la combinación de dos o mas agentes es una piedra angular para el tratamiento del cáncer; permite orientar las vías clave simultáneamente, logrando un aumento de eficacia (Mokhtari *et al.* 2017).

Después de observar el aumento del efecto citotóxico, evaluamos su nuestros resultados se correlacionaron con una actividad antitumoral *in vivo*. A nivel tumoral, se notó la generación de necrosis; cabe mencionar que las lesiones cicatrizaron completamente en todos los casos de eliminación tumoral. Las lesiones cutáneas pueden ocurrir debido a la sobreexposición del factor de necrosis tumoral alfa (Brotas *et al.* 2012). Nuestros resultados revelaron niveles más altos de TNF- α en melanomas no tratados y una disminución significativa de este factor en respuesta a todos nuestros tratamientos. El TNF- α se correlaciona con la agresividad del melanoma y el potencial metastásico *in vivo* (Moreti *et al.* 1999), y Rossi *et al.* Han informado de su sobreexpresión en melanomas primarios avanzados. (Rossi *et al.* 2018).

Es importante mencionar que el TNF- α es una citosina pleiotrópica, y sus efectos proapoptóticos contra las células cancerosas se han descrito ampliamente (Montfort *et al.* 2019); sin embargo, las células de melanoma resisten la apoptosis inducida por TNF- α a través de NF- κ B y óxido nítrico (Soldatenkov *et al.* 1999).

En este estudio, nuestros resultados mostraron una disminución de NF- κ B y óxido nítrico en ratones tratados con Ag, DCA o la combinación de ambos, correlacionándose con la regresión del tumor. Wang y col. Informó que NF- κ B suprime la apoptosis mediada por TNF- α mediante la activación de las proteínas antiapoptóticas TRAF1, TRAF2, c-IAP1 y c-IAP2 (Wang *et al.* 1998). Por otro lado, Salvucci *et al.* Informaron sobre la producción de óxido nítrico en células de melanoma humano, y el bloqueo de esta producción índice la muerte celular en el melanoma humano (Salvucci *et al.* 2001). Específicamente, el óxido nítrico inhibe al menos siete caspasas a través de la s-nitrosilación (Rössig *et al.* 1999).

A pesar de nuestras observaciones, es importante mencionar que el TNF- α , NF- κ B y NO tienen efectos pleiotrópicos y su papel en el melanoma no se conoce bien. Sin embargo, enfatizamos que nuestros resultados indican que estas moléculas disminuyen en correlación con la regresión del tumor y la cicatrización de heridas.

Muchas terapias contra el cáncer tienen el potencial de inducir la muerte de las células cancerosas, lo que da como resultado la eliminación del tumor y un paciente libre de malignidad. Sin embargo, solo los inductores de muerte celular inmunogénica pueden prevenir la recurrencia del cáncer. Por tanto, los fármacos que inducen la muerte celular inmunogénica representan una innovación reciente en el campo de la onco-inmunoterapia (Rapoport *et al.* 2019), tal es el caso de inmunomoduladores INMUNOPOTENT CRP, que recientemente demostró esta capacidad (Rodríguez-Salazar *et al.* 2017). Nos propusimos evaluar si nuestros tratamientos eran capaces de inducir una muerte celular inmunogénica.

La presencia de alarminas *in vitro* indica el potencial de inducir la muerte celular inmunogénica (Terenzi *et al.* 2016). Pero, a pesar del aumento dependiente del tratamiento de HMGB1, HSP70 y HSP90 (pero no calreticulina), la vacunación de ratones

con células B16F10 lisadas con AG, DCA o la combinación indujo la muerte celular inmunogénica como lo demuestra la aparición del tumor en todos los ratones (vacunados y no vacunados) después del desafío con células B16F10 viables. El crecimiento del tumor indica que las vacunas no indujeron una respuesta inmune específica. Una razón de esto podría ser que DCA, Ag y DCA + Ag no inducen la liberación de DAMP en un patrón espacio- tiempo coordinado; por lo tanto, carecen de la capacidad de inducir citosinas y de una presentación eficaz de antígenos (Kepp *et al.* 2013).

8.-CONCLUSIONES

- Los tratamientos *in vitro* con DCA-Na, AgC ejercen efecto citotóxico dependiente de dosis sobre la línea celular murina B16F10.
- Los tratamientos *in vitro* de la combinación de tratamientos empleando DCA-Na, AgC sobre la línea celular B16F10 disminuyen la actividad citotóxica.
- Los tratamientos *in vivo* que involucran AgC, de manera individual o combinada, tienen efecto antitumoral.
- Los tratamientos de DCA-Na, ejercen un efecto de disminución en el crecimiento tumoral.
- La combinación de Ag y DCA tiene propiedades antitumorales potenciales contra las células de melanoma.

9.-LITERATURA CITADA

- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society; 2013
- American Cancer Society. 2015. ¿Cómo se diagnostica el cáncer de piel tipo melanoma? (versión web: www.cancer.org/.../cancerdepieltipomelanoma/).
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson JS, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. 2009. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 27 (36): 6199–6206.
- Barton MK. 2015. Skin self-examination for concerning pigmented lesions appears to be consistent with dermatologist examination. PERSPECTIVES: Research in context 65(6):423-424
- Beers MH. 2006. Manual Merck de Información Médica Para El Hogar (Nueva Edición). Editorial Océano 819-835
- Brotas, J. M. T. Cunha, E. H. J. Lago, C. C. N. Machado, and S. C. S. Carneiro, “Tumor necrosis factor-alpha and the cytokine network in psoriasis,” Anais Brasileiros de Dermatologia, vol. 87, no. 5, pp. 673–683, 2012.
- Croce CM. 2008. Oncogenes and Cancer. New England Journal of Medicine 358 (5): 502–11.
- Dawei, L; Chenchen, M; Suehyun, KC; Sungmo, A; Wounjhang, P. “Experimental demonstration of plasmon enhanced energy transfer rate in NaYF₄:YB₃⁺,Er₃⁺ upconversion nanoparticles”. Scientific Reports, 2016. 6:18894
- Devi PU. 2004. Basics of Carcinogenesis. Health Administrator 17 (1): 16–24.

- Dominguez-Bodoa L. 2004. Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal. Biocancer Research Journal. (versión web disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/235/principios-generales-de-carcinogenesis-carcinogenesis-quimica-y-hormonal>).
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernandez DF, Zapata-Benavides P, Castillo-Leon L, Izasa-Brando C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2006. In Vitro Effects of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract (bDLE) in Cancer Cells. Cytotherapy 8 (4):408–14.
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Sierra-Rivera CA, Zapata-Benavides P, Miranda-Hernández DF, Chávez-Reyes A, Rivera-Morales LG, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2012. *In Vitro* and *in Vivo* Antitumoral Activity of Sodium Dichloroacetate (DCA-Na) Against Murine Melanoma. African Journal of Microbiology Research 6 (22):4782–96.
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Sierra-Rivera CA, Gómez-Flores RA, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Alcocer-González JM, Miranda-Hernández DF, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2010. Antitumor Activity of Colloidal Silver on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR 29:148.
- Guo D, Zhang J, Huang Z, Jiang S, Gu N. 2015. Colloidal Silver Nanoparticles Improve Anti-Leukemic Drug Efficacy via Amplification of Oxidative Stress. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces 126 (February): 198–203.
- Gutiérrez-Vidrio RM, Cortés-Lozano N. 2007. Confrontando Al Melanoma En El Siglo XXI. Med Cutan Iber Lat Am 35 (1): 3–13.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The next Generation. Cell 144 (5): 646–74.
- Hatipoglu, MK, Keleştemur S, Altunbek M, Culha M. 2015. Source of Cytotoxicity in a Colloidal Silver Nanoparticle Suspension. Nanotechnology 26 (19): 195103.
- Hsu PP, Sabatini DM. 2008. Cancer Cell Metabolism: Warburg and beyond. Cell 134 (5): 703–7.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI, 2014.

- Kankotia S, Stacpoole PW. 2014. Dichloroacetate and Cancer: New Home for an Orphan Drug? *Biochimica Et Biophysica Acta* 1846 (2): 617–29.
- Kepp, L. Menger, E. Vacchelli *et al.*, “Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death,” *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 24, no. 4, pp. 311–318, 2013.
- Lansdown ABG. 2010. A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an antimicrobial Agent in Medical Devices. *Advances in Pharmacological Sciences* vol. 2010 ID:910686
- LazarAA-n,A.ZugastiCruz,GAA.jn.A.delaPeAAa, S. Y. S. Belmares, and C. A. Sierra Rivera, “Synergistic cytotoxic effect of sodium dichloroacetate combined with chemotherapeutic drugs on B16F10 murine melanoma cell line,” *Biomedical Research*, vol. 30, no. 1, 2019.
- Love RR, Leventhal H, Easterling DV, Nerenz DR. 1989. Side Effects and Emotional Distress during Cancer Chemotherapy. *Cancer* 63 (3): 604–12.
- Miura K, Green AC. 2015. Dietary Antioxidants and Melanoma: Evidence from Cohort and Intervention Studies. *Nutrition and Cancer* 67 (6): 867–76.
- Mokhtari, T. S. Homayouni, N. Baluch *et al.*, “Combination therapy in combating cancer,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 23, pp. 38022–38043, 2017.
- Moretti, C. Pinzi, A. Spallanzani *et al.*, “Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions,” *International Journal of Cancer*, vol. 84, no. 2, pp. 160–168, 1999.
- Rupert Courtney • Darleen C. Ngo • Neha Malik • Katherine Ververis • Stephanie M. Tortorella • Tom C. Karagiannis “Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K” *Mol Biol Rep* 42:841–851(2015)
- Montfort, C. Colacios, T. Levade, N. Andrieu-Abadie, N. Meyer, and B. Ségui, “The TNF paradox in cancer progression and immunotherapy,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, p. 1818, 2019.
- Organización Mundial e la Salud, 2012.

- Orzan OA, Șandru A, Jecan R. 2015. Controversies in the Diagnosis and Treatment of Early Cutaneous Melanoma. *Journal of Medicine and Life* 8 (2): 132–41.
- Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP. 2013. *Kuby Immunology*. WH Freeman New York. 627-650
- Rapoport and R. Anderson, “Realizing the clinical potential of immunogenic cell death in cancer chemotherapy and radio- therapy,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 4, p. 959, 2019.
- Roberts WE. 2009. Skin Type Classification Systems Old and New. *Dermatologic Clinics* 27 (4): 529–33, viii.
- Rodríguez-Salazar, M. A. Franco-Molina, E. Mendoza- Gamboa *et al.*, “The novel immunomodulator IMMUNEPO- TENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth,” *Oncology Letters*, vol. 14, no. 1, pp. 844–852, 2017.
- Rossi, M. Cordella, C. Tabolacci *et al.*, “TNF-alpha and metalloproteases as key players in melanoma cells aggressive- ness,” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 37, no. 1, p. 326, 2018.
- Rössig, B. Fichtlscherer, K. Breitschopf *et al.*, “Nitric oxide inhibits caspase-3 by S -nitrosation in vivo,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 11, pp. 6823–6826, 1999.
- Russo I, Caroppo F, Alaibac M. 2015. Vitamins and Melanoma. *Cancers* 7 (3): 1371– 87.
- Rughani MG, Gupta A, Middleton MR. 2012. New Treatment Approaches in Melanoma: Current Research and Clinical Prospects. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 5(1) 73–80
- Saranga-Perry V, Ambe C, Zager JS, Kudchadkar RR. 2014. Recent Developments in the Medical and Surgical Treatment of Melanoma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 64 (3): 171–85.

- Salvucci, M. Carsana, I. Bersani, G. Tragni, and A. Anichini, "Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells," *Cancer Research*, vol. 61, no. 1, pp. 318–326, 2001.
- Sierra-Rivera CA. 2011. Efecto Del Dicloroacetato de Sodio Sobre Líneas Celulares de Cáncer *in Vitro* y Sobre Un Modelo de Melanoma Murino. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sierra-Rivera CA, Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2015. Potential of Colloidal or Silver Nanoparticles to Reduce the Growth of B16F10 Melanoma Tumors. *African Journal of Microbiology Research* 7(22):2745-2750
- Stacpoole PW, Henderson GN, Yan Z, James MO. 1998. Clinical Pharmacology and Toxicology of Dichloroacetate. *Environmental Health Perspectives* 106 Suppl 4 (August): 989–94.
- Stacpoole PW. 1989. The Pharmacology of Dichloroacetate. *Metabolism: Clinical and Experimental* 38 (11): 1124–44.
- Soldatenkov, A. Dritschilo, Z. Ronai, and S. Y. Fuchs, "Inhibition of homologue of Slimb (HOS) function sensitizes human melanoma cells for apoptosis," *Cancer Research*, vol. 59, no. 20, pp. 5085–5088, 1999.
- Tataranni T. and Piccoli C., "Dichloroacetate (DCA) and cancer: an overview towards clinical applications," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, 14 pages, 2019.
- Terenzi, C. Pirker, B. K. Keppler, and W. Berger, "Anticancer metal drugs and immunogenic cell death," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 165, pp. 71–79, 2016.
- Valachovic E, Zurbenko I. 2014. Skin Cancer, Irradiation, and Sunspots: The Solar Cycle Effect. *BioMed Research International* 2014: 538574.
- Valenzuela-Salas, N. G. Girón-Vázquez, J. C. García-Ramos *et al.*, "Antiproliferative and antitumour effect of non-genotoxic silver nanoparticles on melanoma models," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, 12 pages, 2019.

- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* (New York, N.Y.) 324 (5930): 1029–33.
- Wang, M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and Baldwin AS Jr, “NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation,” *Science*, vol. 281, no. 5383, pp. 1680–1683, 1998.

